

**Chemoimmuntherapie und immunologische Bedeutung  
von 70 kiloDalton Hitzeschockproteinen  
beim metastasierten Nierenzellkarzinom**

**Habilitationsschrift**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach

UROLOGIE

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. med. Jan Roigas

geboren am 16. Februar 1965 in Potsdam

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen  
Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht am: September 2003

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrags: 18. März 2004

Gutachter: 1. Prof. Dr. A. Hofstetter  
2. Prof. Dr. P. Fornara

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b><u>1. Einleitung</u></b> .....	5
<b>1.1 Nierenzellkarzinom</b> .....	5
<b>1.2 Stand der Forschung</b> .....	8
1.2.1 Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms .....	8
1.2.2 Hitzeschockproteine .....	15
 <b><u>2. Aufgabenstellung</u></b> .....	 25
 <b><u>3. Material und Methoden</u></b> .....	 28
<b>3.1 Chemoimmuntherapie</b> .....	28
3.1.1 Patientengut .....	28
3.1.2 Therapieplan .....	29
3.1.3 Statistische Auswertung .....	30
<b>3.2. Chemoimmuntherapie und synchrone Bestrahlung</b> .....	31
3.2.1 Patientengut .....	31
3.2.2 Therapieplan .....	32
3.2.3 Statistische Auswertung .....	32
<b>3.3 venöse Tumorthromben der Stadien III und IV (nach Staehler)</b> .....	33
3.3.1 Patientengut .....	33
3.3.2 Präoperative Vorbereitung .....	33
3.3.3 Intraoperative Technik – Vena-cava-Zapfen im Stadium III .....	34
3.3.4 Intraoperative Technik – Vena-cava-Zapfen im Stadium IV .....	34
3.3.5 Postoperatives Management .....	34
3.3.6 Chemoimmuntherapie .....	35
3.3.7 Statistische Auswertung .....	35
<b>3.4 Tumor M2-Pyruvatkinase (TU M2-PK)</b> .....	35
3.4.1 Patientengut .....	35
3.4.2 Messung der TU M2-PK .....	37
3.4.3 Statistische Auswertung .....	38
<b>3.5 HSP72-Zellmembranexpression</b> .....	38
3.5.1 Zelllinien und Kulturbedingungen .....	38

	Seite
3.5.2 Isolation und Kultivierung von Primärkulturen .....	38
3.5.3 Verifizierung der epithelialen Herkunft der Zellen .....	39
3.5.4 Hyperthermieexposition .....	40
3.5.5 Durchflusszytometrische Untersuchungen .....	40
3.5.6 Membranpräparation .....	40
3.5.7 Western Blot .....	41
3.5.8 Isolation von NK-Zellen .....	41
3.5.9 In vitro zellvermittelte Lyseexperimente .....	42
<b>3.6 zytoplasmatische HSP72-Expression .....</b>	<b>43</b>
3.6.1 Karzinom- und Normalgewebe .....	43
3.6.2 Patientengut .....	44
3.6.3 Immunhistochemische Untersuchungen .....	45
3.6.4 Semiquantitative Erfassung der HSP72-Expression .....	46
3.6.5 Statistische Auswertung .....	46
<b>3.7 HSP70-Peptid-Komplexe .....</b>	<b>47</b>
3.7.1 Zelllinien und Kulturbedingungen .....	47
3.7.2 Anreicherung von HSP70-Peptid-Komplexen .....	47
3.7.3 Western Blots .....	47
3.7.4 Tierexperimentelle Untersuchungen .....	48
<b><u>4. Ergebnisse</u> .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Klinischer Teil .....</b>	<b>49</b>
4.1.1 Chemoimmuntherapie beim metastasierten Nierenzellkarzinom .....	49
4.1.2 Chemoimmuntherapie und synchrone Bestrahlung .....	56
4.1.3 Therapie von Patienten mit venösen Tumorthromben der Stadien III und IV (nach Staehler) .....	59
4.1.4 Tumor M2-Pyruvatkinase (TU M2-PK) beim Nierenzellkarzinom .....	63
<b>4.2 Experimenteller Teil .....</b>	<b>69</b>
4.2.1 Zellmembranexpression des induzierbaren 72 kDa Hitzeschockproteins beim Nierenzellkarzinom .....	69
4.2.2 Zytoplasmatische Expression des induzierbaren 72 kDa Hitzeschockproteins beim Nierenzellkarzinom .....	78
4.2.3 Anreicherung von HSP70-Peptid-Komplexen .....	86

	Seite
<b><u>5. Diskussion</u></b> .....	90
<b>5.1 Klinischer Teil</b> .....	90
<b>5.2 Experimenteller Teil</b> .....	102
 <b><u>6. Zusammenfassung</u></b> .....	 115
 <b><u>Literaturverzeichnis</u></b> .....	 119
 <b><u>Abkürzungsverzeichnis</u></b> .....	 132
 <b><u>Danksagung</u></b> .....	 134
 <b><u>Eidesstattliche Versicherung</u></b> .....	 136

## **1. Einleitung**

### **1.1 Nierenzellkarzinom**

Das Nierenzellkarzinom (NZK) repräsentiert einen Anteil von etwa 2 bis 3 % aller malignen Erkrankungen. In Deutschland liegt die Inzidenz bei ca. 9 Erkrankungen pro 100,000 Einwohner [144]. Für das Jahr 2003 wurde eine Anzahl von 31,900 Neuerkrankungen an einem NZK mit insgesamt 11,900 Todesfällen für die USA berechnet [89]. Derzeit ist eine jährliche Steigerung der Inzidenz um 0,68 bis 3,7 % pro 100,000 Einwohner zu beobachten, wobei Männer etwa doppelt so häufig erkranken wie Frauen [78]. Neben der Erhöhung der Inzidenz ist auch ein Anstieg in der krankheitsspezifischen Mortalität verzeichnet worden [78]. Während man 1985 weltweit von 54,000 Todesfällen bedingt durch das NZK ausging, wurde für das Jahr 2000 eine Anzahl 102,000 Todesfällen berechnet [116]. Der Anstieg der Inzidenz des NZK wird einerseits auf die Verbesserung und den breiteren Einsatz diagnostischer Techniken, wie Ultraschall und Computertomographie zurückgeführt, andererseits zeigt die höhere Sterblichkeit in allen Stadien an, dass auch andere Faktoren für die Erhöhung der Inzidenz verantwortlich gemacht werden müssen [78]. Derzeit werden 25 – 60 % aller NZK als inzidentelle Karzinome diagnostiziert [88,116]. Für das NZK besteht ein Altersgipfel in der 5. bis 7. Lebensdekade.

80 bis 85 % aller malignen Tumoren der Niere sind von den renalen Epithelzellen ausgehende Nierenzellkarzinome. Auf der Basis bestimmter immunhistochemischer und zytogenetischer Eigenschaften werden derzeit 5 histologische Subtypen (Typing) unterschieden [185]. Am häufigsten tritt in etwa 70 % das hellzellige NZK auf. Weiterhin werden das papilläre NZK (Häufigkeit 10 bis 15 %), das chromophobe NZK (Häufigkeit 5 %) und das Sammelrohrkarzinom (Häufigkeit < 1 %) differenziert [185]. Etwa 4 bis 5 % sind nicht klassifizierbare Karzinome, die sich keinem bestimmten Subtyp zuordnen lassen und mit einer ungünstigen Prognose verbunden sind [185, 221].

Die pathomorphologische Einteilung des NZK (Staging) erfolgt nach der TNM-Klassifikation maligner Tumoren von 2002 und unterscheidet [173]:

- lokal begrenzte pT1 Karzinome bis zu einer Größe von 7 cm
  - Karzinom kleiner als 4 cm (pT1a)
  - Karzinom größer als 4 cm (pT1b)
- lokal begrenzte pT2 Karzinome mit einer Größe über 7 cm
- lokal fortgeschrittenen pT3 Karzinomen mit
  - Fettkapseldurchbruch bzw. ipsilateralem Nebennierenbefall (pT3a)
  - Vena-cava-Invasion durch einen Tumorthrombus unterhalb des Zwerchfells (pT3b)
  - Vena-cava-Invasion durch einen Tumorthrombus oberhalb des Zwerchfells (pT3c)

- lokal fortgeschrittene pT4 Karzinome mit einer Invasion jenseits der Gerota-Faszie.

Beim Grading des NZK hat sich die Berücksichtigung zytomorphologischer und vor allem nukleärer Eigenschaften bewährt und zur Einteilung in drei Grade (G1-G3) geführt [189].

Der Lymphknotenstatus wird als pN0 klassifiziert, wenn keine Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden konnten. Der Befund pN1 gilt, wenn eine solitäre regionäre Lymphknotenmetastase diagnostiziert werden konnte. Bei mehr als einer regionären Lymphknotenmetastase wird der Status als pN2 bezeichnet.

Dem fehlendem Nachweis von Fernmetastasen (M0) steht das Vorhandensein von Fernmetastasen (M1) gegenüber.

Die Einteilung der Erkrankung in 4 Stadien erfolgt derzeit entweder nach den UICC Empfehlungen oder nach Robson [155,173]. Dabei gilt das jeweilige Stadium IV für die metastasierte Erkrankung. Die UICC- und Robson-Klassifikation sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt.

Tab. 1) Stadieneinteilung nach UICC [173].

UICC	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1/2	N1	M0
	T3	N0/1	
IV	T4	N0/1	M0
	jedes T	N2	M0
	jedes T	jedes N	M1

Tab. 2) Robson-Klassifikation mit der jeweils entsprechenden TNM-Klassifikation [155].

Robson	TNM
I	T1/2
II	T3a
III a	T3b/3c
III b	N1/2
IVa	T4
IV b	M1

Die Standardtherapie des NZK besteht in der radikalen Tumornephrektomie mit Adrenalektomie und lokoregionärer Lymphadenektomie. Diese Operation kann prinzipiell von einem transperitonealen oder retroperitonealen Zugangsweg aus durchgeführt werden. Zunehmend gewinnt auch die laparoskopische radikale Tumornephrektomie als minimal invasiver Eingriff an klinischer Bedeutung.

Die operative Therapie des NZK unterliegt derzeit weiteren Wandlungen, wie dem Verzicht auf die Adrenalektomie bei Tumoren im Mittel- oder Untergeschoss der Niere und der offenen oder laparoskopischen organerhaltenden Operation bei kleineren, peripher gelegenen NZK als elektive Indikation.

Bei ca. 25 bis 30 % der Patienten bestehen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines NZK bereits Metastasen [121]. Im weiteren Verlauf der Erkrankung nach Tumornephrektomie entwickeln bis zu 25 % der Patienten lokale Rezidive oder Fernmetastasen [104,151]. Diese Zahlen verdeutlichen, dass ein Großteil der auch unter kurativer Absicht primär operierten Patienten in der Nachbeobachtung mit der Diagnose eines metastasierten NZK konfrontiert werden.

Während für das lokalisierte NZK stadienabhängig 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 60 bis 100 % beobachtet werden, liegen die 5-Jahres-Überlebensraten bei unbehandelten Patienten mit einer metastasierten Erkrankung unter 5 bis 10 % [51,121,122]. Metastasen eines NZK treten in bis zu 70 % in den Lungen auf. Als weitere häufige Metastasenlokalisationen gelten das Skelettsystem, die Leber, Lymphknoten und lokale Rezidive. Aber auch seltene Metastasenlokalisationen, wie z.B. im Bereich des Nasen-Rachenraums, in Drüsengewebe oder im Myokard sind beim NZK beschrieben worden [1,40,68,148,160].

Sowohl für das lokal begrenzte als auch für das metastasierte NZK sind eine Reihe von prognostischen Faktoren klinisch anerkannt. Bei der Einteilung der zahlreichen tumor-, therapie- und patientenbezogenen prognostischen Faktoren ist die Klassenbildung des American College of Pathologist's hilfreich [73]. Diese Klassifikation differenziert zwischen klinisch akzeptierten, allgemein anerkannten Faktoren (Klasse I), klinisch ansatzweise geprüften Faktoren (Klasse IIa), den biologisch bestätigten Faktoren (Klasse IIb) und den noch wenig evidenten Faktoren (Klasse III). Zu den Tumor-bezogenen Faktoren der Klasse I zählen die T-Kategorie, das Grading, der Lymphknotenstatus sowie der hellzellige histologische Subtyp. Als Patienten-bezogene Faktoren sind Symptome zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, Gewichtsverlust, der Allgemeinzustand des Patienten, das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen, eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit, Anämie, Hyperkalzämie oder eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase akzeptiert. Zu den Therapie-assoziierten Faktoren wird der R-Status (R2, makroskopischer Residualtumor) gezählt [174]. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass

auch die Durchführung einer Immuntherapie einen prognostisch unabhängigen Risikofaktor darstellt [220].

## **1.2 Stand der Forschung**

### **1.2.1 Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms**

Es gilt derzeit als anerkannte Lehrmeinung, dass konventionelle Therapiestrategien, wie Bestrahlung, Hormon- oder Chemotherapie kaum eine klinische Bedeutung bei der Behandlung des metastasierten NZK haben.

Das Nierenzellkarzinom gilt als strahlenresistente Tumorentität. Der Wert der Bestrahlung liegt in der palliativen Behandlung symptomatischer Knochenmetastasen und der stereotaktischen Bestrahlung bzw. Ganzhirnbestrahlung beim Auftreten von Hirnmetastasen [41,58,170]. Adjuvante Protokolle haben keinen Vorteil einer Bestrahlung zeigen können [52,96]. Prospektiv randomisierte Studien hinsichtlich des Effektes der Strahlentherapie bei der metastasierten Erkrankung sind nicht bekannt.

Für die Resistenz des NZK gegenüber antineoplastischen Substanzen wird die hohe Expression von Multi-Drug-Resistance-Genprodukten verantwortlich gemacht [57]. Mehrere Übersichtsartikel haben die Ergebnisse von Studien zum Einsatz verschiedenster Zytostatika zusammengefasst [5,124,215]. Selbst moderne Substanzen haben beim fortgeschrittenen NZK mit Ansprechraten von unter 10 % nur eine geringe klinische Wirksamkeit gezeigt und der standardisierte Einsatz einer antineoplastischen „first-line“-Monotherapie kann derzeit nicht empfohlen werden [5].

Der Nachweis von Estrogen- und Progesteronrezeptoren beim NZK hat die klinische Rationale zum Einsatz von Hormonen im metastasierten Stadium geliefert. Eine initiale Studie mit Progesteron wies eine objektive Remissionsrate von 16 % auf [25]. Studien unter Anwendung von Tamoxifen oder Toremifen zeigten jedoch nur einen geringen Anteil an Kurzzeit-Remissionen ohne Nachweis einer Überlebensverlängerung [15,62,168,182].

Die fehlende Wirksamkeit konventioneller Therapieoptionen beim fortgeschrittenen NZK verdeutlicht das therapeutische Dilemma und den Bedarf an neuen, innovativen und effektiven Behandlungskonzepten im klinischen Umgang mit der metastasierten Erkrankung.

Mit dem erstmaligen klinischen Einsatz des Zytokins Interleukin-2 (IL-2) durch Rosenberg et al. 1985 wurde das therapeutische Spektrum zur Behandlung maligner Erkrankungen und insbesondere des metastasierten NZK wesentlich erweitert und bereichert [161]. In der ersten



Veröffentlichung hatte Rosenberg Patienten mit verschiedenen malignen metastasierten Tumoren, darunter auch Patienten mit metastasierten NZK, mit intravenösem IL-2 und autologen Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK-Zellen) systemisch behandelt und objektive Remissionen bei 11 von 25 Patienten beobachtet [161]. In einer größeren Studie an insgesamt 157 Patienten konnten diese Ergebnisse untermauert werden und somit der Grundstein zu einer modernen, Zytokin-basierten Immuntherapie für die Behandlung des metastasierten NZK gelegt werden [162]. Die Etablierung der Immuntherapie als unspezifische Aktivierung des Immunsystems auf der Grundlage der systemischen Wirkung von Zytokinen wurde in den folgenden Jahren vorangetrieben. Verschiedene Zytokine, Kombinationen von Zytokinen, Dosierungen und Therapiepläne wurden in einer kaum überschaubaren Anzahl von Phase I und II Studien und nur wenigen Phase III Studien hinsichtlich ihrer klinischen Wirksamkeit geprüft. Nach dem bisherigen Kenntnisstand werden derzeit die beiden humanen, rekombinanten Zytokine IL-2 und Interferon- $\alpha$ 2 (IFN- $\alpha$ 2) als klinisch wirksam angesehen und haben sich bei der Behandlung des metastasierten NZK durchgesetzt.

Mit einer IFN- $\alpha$ -basierten Immuntherapie können objektive Remissionen in etwa 10 – 15 % erzielt werden. Wirth hat in einem Übersichtsartikel eine Remissionsrate von 12 % angegeben [214]. In größeren Studien konnte ein Überlebensvorteil einer IFN- $\alpha$  Therapie gegenüber anderen Behandlungen gezeigt werden. In der Studie von Pyrhönen et al. an 160 Patienten wies die Kombination von IFN- $\alpha$  und Vinblastin mit 9,6 Monaten ein signifikant verlängertes medianes Überleben im Vergleich zu einer Vinblastin-Monotherapie mit 5,4 Monaten auf ( $p=0,0049$ ) [150]. Der Überlebensvorteil war signifikant, jedoch deutlich geringer ausgeprägt in einer Studie der Medical Research Council Renal Cancer Collaborators mit 335 Patienten, die eine IFN- $\alpha$  Monotherapie mit Medoxyprogesteronazetat prospektiv randomisiert verglich (medianes Überleben 8,5 Monate vs. 6 Monate) [114].

Die Behandlung mit IL-2 erfolgte zunächst intravenös und hat auf dieser Basis zur Zulassung durch die FDA in den USA geführt. In Deutschland erfolgte durch die Arbeitsgruppe um Atzpodien die Etablierung der subkutanen Applikation [10]. Derzeit existieren für IL-2 hoch- und mittel-dosierte intravenöse sowie niedrig-dosierte subkutane Therapieschemata. Die Zusammenfassung der Ergebnisse der IL-2-Monotherapie der verschiedenen Applikationsformen und Dosierungen, teilweise in Kombination mit Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK-Zellen), ergab bei 29 berücksichtigten Studien mit insgesamt 1350 Patienten eine objektive Remissionsrate von 17,9 % [14]. Eine Langzeit-Überlebensanalyse von insgesamt 7 Studien mit 255 Patienten, die mit hochdosiertem intravenösem IL-2 behandelt worden waren, ergab bei

einer objektiven Remissionsrate von 15 % ein medianes Überleben von 16,3 Monaten mit einer kalkulierten 5- und 10-Jahres-Überlebensrate zwischen 10 bis 20 % [54]. Ähnliche Ergebnisse mit einem medianen Überleben von mehr als 21 Monaten, sowie einer 5- und 13-Jahres-Überlebensrate von 16 und 9 % beobachteten auch Atzpodien et al. bei der Analyse von 443 Patienten aus 3 konsekutiven klinischen Studien [16].

Die Kombination von IL-2 und IFN- $\alpha$ 2a ist in einer Vielzahl von Studien mit unterschiedlichen Dosierungen und Therapieschemata untersucht worden. Die CRECY-Studie (Cancer du Rein Étude Cytokine) hat als prospektiv randomisierte Phase-III-Studie die jeweilige Monotherapie mit IL-2 (kontinuierlich intravenös) und IFN- $\alpha$ 2a (subkutan) mit der Kombination beider Zytokine an 425 Patienten verglichen. Hierbei zeigten sich objektive Remissionen für IL-2 von 7,5 % und für IFN- $\alpha$ 2a von 6,5 %, die signifikant niedriger waren als die der Kombination mit 18,6 %. Ebenso war das progressionsfreie Ein-Jahres-Überleben signifikant zugunsten der Kombinationstherapie verbessert (15 % für IL-2, 12 % für IFN- $\alpha$ 2a und 20 % für die Kombination). Damit zeigte sich zunächst ein positiver Effekt der beiden Zytokine im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie.

Die Unterschiede im Ansprechen und im Ein-Jahres-progressionsfreien Überleben schlugen sich in dieser Studie jedoch nicht auf das mediane Überleben nach längerer Nachbeobachtung nieder, das zwar mit 17 Monaten für die Kombination im Vergleich zu 12 Monaten für IL-2 und 13 Monaten für IFN- $\alpha$ 2a verlängert war, jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte ( $p=0,55$ ) [136].

Brinkmann et al. haben in einer Übersichtsarbeit die Ansprechraten der kombinierten Zytokintherapie mit IL-2 und IFN- $\alpha$  verschiedener Studien verglichen. In 18 Studien mit insgesamt 767 Patienten traten kumulativ bei 149 Patienten (19 %) objektive Remissionen auf [34].

Mit der Veröffentlichung der ersten französischen Daten erschien auch eine retrospektive Arbeit der Hannoveraner Gruppe um Atzpodien, die an 215 Patienten die IL-2 Monotherapie mit der Kombination von IL-2 und IFN- $\alpha$ 2a als Zweifachtherapie und der zusätzlichen Kombination mit der antineoplastischen Substanz 5-Fluorourazil (5-FU) als Dreifachtherapie verglich [108]. Die Analyse untersuchte retrospektiv Daten verschiedener Phase-II-Behandlungsprotokolle. Es zeigte sich interessanterweise eine klare Überlegenheit der Dreifachkombination mit einer objektiven Remissionsrate von 39 % (47 von 120 Patienten) gegenüber der Zweifachtherapie mit

28 % (22 von 79 Patienten). Nach Risikostratifizierung der Patienten ergab sich für die Gruppe mit einem mittleren Risikoprofil eine signifikant höhere Zwei-Jahres-Überlebensrate von 65 % gegenüber 27 % für die Zweifachkombination [108].

Auf der Basis dieser Daten und nach Formierung der Deutschen Gruppe zur Chemoimmuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms (DGCIN) wurden 3 prospektiv randomisierte Studien initiiert (Protokolle DGCIN-93, DGCIN-95 und DGCIN-98).

Während das DGCIN-93-Protokoll die Dreifachkombination von IL-2, IFN- $\alpha$ 2a und 5-FU gegen eine Tamoxifen-Monotherapie als quasi-Null-Arm verglich, wurde mit den Protokollen DGCIN-95 und DGCIN-98 versucht, dass Konzept der Dreifachkombination konsequent weiter zu entwickeln.

Das DGCIN-93-Protokoll wies prospektiv an einer kleinen Zahl von 78 Patienten einen signifikanten Vorteil der Therapie mit IL-2, IFN- $\alpha$ 2a und 5-FU (41 Patienten) gegenüber Tamoxifen (37 Patienten) nach. Die objektiven Remissionen in der Zytokingruppe lagen bei 39 % versus 0 % in der Tamoxifengruppe. Das mediane Überleben betrug 24 Monate für die Dreifachtherapie versus 13 Monate für Tamoxifen mit einer signifikant verbesserten Fünf-Jahres-Überlebensrate von 24,8 % versus 13,5 % ( $p=0,03$ ) [15].

Auch retrospektiv schien die zusätzliche Gabe von 5-FU zu den beiden Zytokinen die Rate objektiver Remissionen erhöht zu haben. Die kumulativen Ergebnisse von 13 Studien mit 552 Patienten führten, wenn auch unter Anwendung modifizierter Dreifachkombinationen, zu objektiven Remissionen bei 162 Patienten (29 %) [34].

Diese Daten haben das Konzept der Dreifachkombination von subkutanem IL-2 und IFN- $\alpha$ 2a und intravenösem 5-FU untermauert und zu einem de facto Standard in Deutschland gemacht. Dies wurde durch eine Befragung der Hamburger Arbeitsgruppe um Hüland deutlich, die zeigen konnte, dass die Chemoimmuntherapie bei 94 von insgesamt 147 Zentren das „first-line“-Therapieschema darstellt [82].

Dennoch werden die Ergebnisse der Dreifachtherapie in Bezug auf Ansprechraten und Überleben in der Literatur unterschiedlich diskutiert. Im Gegensatz zu Studien, insbesondere aus dem deutsch- und auch angloamerikanischen Raum, die ermutigende Ergebnisse bei akzeptabler Toxizität des Therapieregimes zeigten [2,13,45,80,108,164], konnten französische Studien und Studien aus den Benelux-Ländern diese Resultate nicht bestätigen [137,152,193,200].

Die kontroversen Ergebnisse deuten auf den Bedarf und die Notwendigkeit der Erfassung der Ergebnisse der Dreifachkombination von IL-2, IFN- $\alpha$ 2a und 5-FU hin. Andererseits besteht die

Notwendigkeit weiterer, prospektiv randomisierter Phase-III-Studien. In diesem Zusammenhang ist die EORTC-Studie 30012 zum prospektiven Vergleich des Dreifachtherapieschemas gegenüber einer IFN- $\alpha$ 2a-Monotherapie erwähnenswert.

Zusammenfassend haben Coppin et al. auf der Basis der unzureichenden Datenlage in einer Übersicht zum derzeitigen Kenntnisstand der Behandlung des metastasierten NZK in einem Cochrane-Review folgende, ernüchternde Schlussfolgerungen gezogen [39]:

1. Die Wirksamkeit von hochdosiertem IL-2 ist nicht durch Phase-III-Studien belegt, die Anwendung von IL-2 basiert auf den Ergebnissen von Phase-II-Studien.
2. IFN- $\alpha$  bewirkt eine 2,6monatige Verlängerung des medianen Überlebens, eine Erhöhung der 1-Jahres-Überlebensrate auf 27 % und eine Reduktion des 2-Jahres-Sterberisikos um 22 % im Vergleich zu nicht-behandelten Patienten.
3. Die Kombination von IL-2 und IFN- $\alpha$  wird nur in klinischen Phase-III-Studien empfohlen.

Unter den Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen, die mit einer Chemoimmuntherapie behandelt werden, bilden diejenigen mit Skelettmetastasen oder großen lokalen Rezidiven eine ungünstige Subgruppe mit geringen Remissionsraten und einer schlechten Prognose. Unterschiedliche Ansprechraten auf eine Immuntherapie bei bestimmten Metastasenlokalisationen sind von einer Reihe von Autoren beschrieben worden. Lopez-Hänninen berichtete über 49 % objektive Remissionen bei Patienten mit Lungenmetastasen im Vergleich zu 33 und 36 % bei Patienten mit lokalen Rezidiven und Skelettmetastasen. Komplette Remissionen traten in dieser Untersuchung überwiegend bei Patienten mit Lungenmetastasen auf [108]. Hofmockel beobachtete 33 % objektive Remissionen bei Lungenmetastasen, jedoch nur 7 % bei lokalen Rezidiven, Lymphknoten- oder Skelettmetastasen [80]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Samland veröffentlicht mit 39 % objektiver Remissionen bei Lungenmetastasen und 6 % bei Lymphknotenmetastasen. Bei Skelettmetastasen wurden keine Remissionen beobachtet [164]. Zudem leiden Patienten mit diesen Metastasenlokalisationen häufiger an Symptomen wie Schmerzen, pathologischen Frakturen, Kompressionssyndromen, neurologischen Symptomen oder Subileen [32]. In der Literatur gibt es eine Reihe experimenteller aber auch erster klinischer Hinweise darauf, dass durch eine synchrone Kombination von Immuntherapie und Bestrahlung eine Steigerung des therapeutischen Effektes erzielt werden kann [32,36,46,217,218]. Unter der Zielsetzung, die präliminären klinischen Daten zu ergänzen, sollen retrospektiv 20 Patienten hinsichtlich Ansprechrate, Toxizität und

Überleben untersucht ausgewertet, die an unserer Klinik mit der synchronen Kombination von Immuntherapie und Bestrahlung behandelt worden waren.

In 5 bis 10 % entwickelt sich bei Patienten mit einem Nierenzellkarzinom ein vitaler Tumorthrombus in der Vena renalis oder Vena cava inferior. Etwa ein Drittel dieser Patienten weist eine zusätzliche Fernmetastasierung auf. Das Ausmaß der Tumorextension in der Vena cava inferior stellt einen entscheidenden Faktor für die operative Vorgehensweise dar. Von Staehler und Mitarbeiter wurde unter Berücksichtigung operationstechnischer Aspekte eine allgemein anerkannte Einteilung des Vena-cava-Befalles vorgenommen [179].

Tab. 3) Einteilung des Vena-cava-Zapfen nach Staehler [179].

Einteilung	Ausdehnung des Vena-cava-Thrombus
Stadium I	infrahepatisch
Stadium II	infradiaphragmal unterhalb der Leberveneneinmündung
Stadium III	infradiaphragmal oberhalb der Leberveneneinmündung
Stadium IV	supradiaphragmal

Insbesondere für Patienten mit Vena-cava-Zapfen der Stadien III und IV (infradiaphragmal-suprahepatisch oder supradiaphragmal) stellt die operative Therapie, trotz der operationstechnischen Fortschritte der letzten Jahre, eine interdisziplinäre Herausforderung dar. Die Indikationsstellung zur Durchführung des Eingriffes sollte hier individuell, unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes, des Vorhandenseins von Komorbiditäten und der Präsenz von Fernmetastasen erfolgen. Während in der Vergangenheit diese Indikation relativ streng gestellt wurde, und bei Vorliegen von Fernmetastasen eine operative Therapie prinzipiell als nicht indiziert galt, zeichnet sich inzwischen die Tendenz zu einer Erweiterung der OP-Indikation auch für Patienten mit Metastasen ab [135]. Dies ist einerseits darauf zurückzuführen, dass beim Vorliegen von Metastasen die perioperative Komplikationsrate nicht erhöht scheint [219]. Andererseits hat sich das klinische Management der metastasierten Erkrankung durch die Kombination von Operation und Immuntherapie verbessert.

Seit 1992 wurden an unserer Klinik auf interdisziplinärer Ebene zusammen mit Kardio- und Gefäßchirurgen Patienten mit Nierenzellkarzinomen mit infradiaphragmal-suprahepatischem

oder supradiaphragmalem Vena-cava-Befall (Stadium III und IV nach Staehler) operiert und nachbetreut [163,167]. In dieser Arbeit sollen die operativen Ergebnisse und der postoperative weitere Verlauf von 24 Patienten, die im Zeitraum von Juli 1992 bis November 2000 behandelt worden waren, untersucht werden. Mit einer multivariaten Analyse soll geprüft werden, ob die kraniale Ausdehnung des Zapfens der Stadien III und IV im eigenen Patientengut einen prognostisch signifikanten Prognosefaktor darstellt und damit einen Einfluss auf das gegenwärtige Behandlungskonzept von aggressiv-chirurgischem Vorgehen in Kombination mit einer Chemoimmuntherapie im metastasierten Stadium hat.

Das klinische Management des metastasierten NZK beinhaltet häufig die operative Entfernung des Primärtumors und die nachfolgende Immuntherapie zur Behandlung der Metastasen. Das Konzept von Operation und Immuntherapie konnte anhand zweier bedeutsamer prospektiver Studien (EORTC und SWOG) untermauert werden, die einen Überlebensvorteil für diese Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen mit Patienten, die nur immuntherapiert wurden, nachwiesen [55,117]. Die Durchführung einer Immuntherapie bei Patienten mit synchron oder metachron metastasierten Nierenzellkarzinomen setzt ein regelmäßiges Staging mit konventioneller Röntgendiagnostik, Computertomographie (CT), Ganzkörperskelettszintigraphie (GKSZ) oder Magnetresonanztomographie (MRT) voraus und ist Konsequenz dieses intensiven Therapiekonzeptes.

Das Vorhandensein eines biologischen Markers, ähnlich wie das Prostata-spezifische Antigen (PSA) beim Prostatakarzinom oder alpha-Fetoprotein (AFP) und humanes  $\beta$ -Choriongonadotropin ( $\beta$ -HCG) bei den malignen Keimzelltumoren des Hodens, würde die Nachbeobachtung und Kontrolle der Patienten erheblich erleichtern.

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein spezifisches Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels, die Tumor-spezifische Form der M2-Pyruvatkinase (TU M2-PK) in malignen Zellen verstärkt exprimiert wird und auch im peripheren Blut von Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen, wie dem Kolonkarzinom, Pankreaskarzinom, NZK und Bronchialkarzinom nachzuweisen ist [31,47,53,141,142,201,207,208].

Die erhöhte Expression der TU M2-PK ist bedingt durch Veränderungen im Stoffwechsel maligner Zellen im Vergleich zu normalen Zellen, insbesondere einer erhöhte Rate der aeroben Glykolyse. Die spezifischen Stoffwechselregulationen erfordern Anpassungen der Kapazität glykolytischer Enzyme und Isoenzymmuster [112,183]. Die Pyruvatkinase ist ein Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels, das in der Expression seiner Isoenzyme (L-PK, R-PK, M1-PK, M2-PK) gewebespezifisch variiert. In normalen Zellen existieren die Isoformen als enzymatisch

aktive Tetramere. In malignen Zellen ist jedoch die inaktive dimere oder monomere Form des M2-Isoenzyms stärker ausgeprägt und trägt über eine reduzierte Phosphoenolpyruvat-Affinität zu einer Erhöhung der aeroben Glykolyse bei [112].

Präliminäre Untersuchungen zur Pyruvatkinase haben gezeigt, dass das Enzym nicht als Marker zur Frühdiagnose maligner Raumforderungen der Niere geeignet ist. In den soll daher geprüft werden, inwieweit die TU M2-PK als Marker bei anderen urologischen Krebserkrankungen geeignet ist. Unter der Hypothese, dass beim metastasierten NZK eine höhere Sensitivität und Spezifität als bei der organbegrenzten Erkrankung vorliegen, soll die TU M2-PK bei Patienten mit metastasierten NZK unter Chemoimmuntherapie bestimmt und seine Eignung als Verlaufsparemeter beurteilt werden.

### **1.2.2 Hitzeschockproteine**

Die Weiterentwicklung des immuntherapeutischen Behandlungskonzeptes beim metastasierten NZK beinhaltet zum Einen die Optimierung zytokin-basierter Therapieansätze, die auf einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems basieren.

Andererseits sind aktuelle experimentelle Strategien auf die Etablierung spezifisch wirksamer Vakzinen im adjuvanten und metastasierten Stadium der Erkrankung gerichtet. Hitzeschockproteine (HSP) spielen hierbei auf Grund ihrer biologischen Eigenschaften eine besondere Rolle.

HSP stellen eine multifamiliäre Gruppe azider, genetisch hochkonservierter Proteine mit einem molekularen Gewicht von 8 bis 110 kDa dar. HSP sind von Bedeutung zum Erhalt zellulärer Normalfunktionen, spielen aber auch eine außerordentliche Rolle bei der zellulären Reaktion auf eine Hyperthermie. Da neben einer Hyperthermieapplikation auch andere Veränderungen des zellulären Mikromilieus die rasche Expression von HSP induzieren können, wurden diese wegen ihres Zusammenhanges mit der zellulären Stressantwort auch als Stressproteine bezeichnet. Prinzipiell werden HSP in fünf große Gruppen eingeteilt (siehe Tab. 4, adaptiert von [119]).

Tab. 4) verschiedene HSP-Klassen

HSP-Klasse	Lokalisation	Funktion
Ubiquitin (8 kDa)	Zytosol, Nukleus	Bindung an Histone und Proteine
HSP28	Zytosol, Nukleus	Mikrofilamentstabilisation, Signaltransduktion
HSP60	Mitochondrien	Proteinimport und Proteinsynthese
HSP70	Zytosol, Nukleus, ER Mitochondrien	Peptidprozessierung, Proteinfaltung, Proteintransduktion
HSP90	Zytosol, Nukleus, ER	Rezeptorregulation (Steroidhormone), Peptidprozessierung, Proteinfaltung
HSP110	Zytosol	Prozessierung hitzedenaturierter Proteine

Sehr intensiv in Bezug auf die Funktion der HSP im Rahmen der zellulären Stressantwort wurde die Reaktion auf eine Hyperthermieexposition untersucht. Hitzeschockproteine sind an der Herausbildung des Phänomens der Thermotoleranz beteiligt. Dieses Phänomen wurde von Gerner und Schneider sowie Henle und Leeper erstmalig beschrieben [61,71]. Thermotoleranz bedeutet, dass Zellen nach konditionierender subletaler Hyperthermieexposition tolerant gegenüber einem subsequenten letalen hyperthermen Stress werden [72]. Funktionen, die den HSP unter den Bedingungen der Stressverarbeitung nach Hyperthermieexposition zugeschrieben werden, betreffen in erster Linie die Faltung von Proteinen, die Auflösung von Proteinaggregaten, die Proteinsynthese und den -abbau, sowie die Spaltung von Protein-Protein-Interaktionen [106]. Man konnte zeigen, dass die Entwicklung des thermotoleranten Status von Zellen mit der Kinetik der intrazellulären Akkumulation von HSP korreliert [106].

Neben der klassischen Hyperthermie können eine Reihe anderer Faktoren, die das zelluläre Mikromilieu verändern, die Synthese von HSP induzieren (siehe Tabelle 5). Verschiedene metabolische Zustände, aber auch bestimmte antineoplastische Substanzen, Schwermetalle und Zytokine sind als Auslöser der HSP-Synthese identifiziert worden. Dies macht auf die Bedeutung der HSP im Rahmen der zellulären Stressverarbeitung, aber auch der zellulären Toleranz- bzw. Resistenzentwicklung auf andere Stressformen aufmerksam.



Tab. 5) Faktoren, die die Synthese von HSP induzieren (adaptiert von [119]).

Hyperthermie/Hypothermie
Energiedefizit (ATP)
Ischämie/Reperfusion
oxidativer Stress
$\gamma$ -Strahlen
Chemotherapeutika (Adriamycin, Bleomycin, N-Lost-Verbindungen)
Schwermetalle (cis-Platin)
Zytokine (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-1)

In einer Vielzahl von klinischen Studien ist die basale und stress-induzierte Expression von HSP in Tumorzellen und deren Bedeutung für die zelluläre Resistenzlage untersucht und nachgewiesen worden [38,74,83,140,157,171]. Aus medizinischer Sicht hat die Beteiligung von HSP an der Herausbildung zellulärer Resistenzzustände folglich eine unmittelbare Bedeutung für den klinischen Einsatz der Hyperthermie und ihrer Kombination mit anderen therapeutischen Modalitäten.

Neben ihrer Funktion im Rahmen der zellulären Stressantwort und für Resistenzentwicklungen stehen zunehmend die tumorbiologischen Eigenschaften bestimmter HSP im Interesse der klinischen Forschung. Dabei spielen zwei Mitglieder der 70 kDa HSP-Familie (HSP70), das 72 kDa HSP (HSP72) und das 73 kDa HSP (HSP73) sowie das 96 kDa Protein gp96 eine besondere Rolle.

Die aus der speziellen Funktion dieser HSP ableitbare Bedeutung für bestimmte Fragestellungen beim NZK bezieht sich in erster Linie auf:

- die basale und Hyperthermie-induzierte Expression des Proteins HSP72 auf der Zellmembran maligner Zellen und deren Einfluss auf die Lyse durch IL-2 stimulierte Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)
- die basale Expression von HSP72 im Zytosol maligner Zellen als prognostischer Parameter
- die aus der Peptidbindungsfähigkeit von HSP herrührende potentielle Bedeutsamkeit dieser Proteine (HSP70 und gp96) für Vakzinationskonzepte auf der Basis von Protein-Peptid-

Vakzinen einerseits und für die Identifikation und Charakterisierung biologisch aktiver Peptide andererseits.

Auf die genannten Problemstellungen soll im folgenden kurz eingegangen werden.

#### Zellmembranexpression des induzierbaren 72 Da Hitzeschockproteins

Die 72 kDa und 73 kDa Hitzeschockproteine werden zur Familie der 70 kDa Hitzeschockproteine gezählt. HSP73 wird in Zellen konstitutiv exprimiert und die HSP73-Konzentration im Zytoplasma steigt nach einem Hitzeschock nur um etwa das Dreifache an [125]. Dagegen gilt HSP72 als klassisches, Hitzeschock-induzierbares Protein mit einer dramatischen intrazellulären Akkumulation auf bis zum Zwanzigfachen [125]. Beide Proteine weisen eine hohe Sequenzhomologie von über 90 % auf und sind unter Normal- und Stressbedingungen an Protein-Protein-Interaktionen wie Faltungsvorgängen, Translokationen und Stabilisierungen beteiligt [106]. In malignen Zellen erfüllt HSP72 ähnliche zelluläre Funktionen wie in gesunden Zellen und ist traditionellerweise im Zytosol lokalisiert [93,213]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass HSP72 und andere Hitzeschockproteine auch auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden können [3,42,49,75,77,95,125]. So konnten Di Cesare et al. durchflusszytometrisch HSP72 nach Hyperthermie (45 °C für 15 min) und nach chronischer HIV-Infektion auf der Zelloberfläche von humanen H9-Lymphomzellen nachweisen [42]. In einer anderen Studie von Ferrarini et al. wurde die Expression von HSP90 und HSP72 an verschiedenen humanen Tumorzelllinien und Primärkulturen untersucht. An den etablierten Tumorzelllinien wurden 2- bis 10fach höhere intrazelluläre HSP90 Konzentrationen als an Normalzellen gemessen und 2 der Linien exprimierten HSP72 auch ohne Stressexposition. Des Weiteren fanden die Autoren ein heterogenes intrazelluläres Expressionsmuster beider Proteine an frischen Tumorzellen, darunter 2 Nierenkarzinome. Sowohl HSP90 und in einem geringeren Maße auch HSP72 wurden durchflusszytometrisch auf der Zelloberfläche verschiedener Karzinomzellen nachgewiesen [49].

Von Multhoff et al. wurde die Oberflächenexpression von HSP72 auf Tumorzellen untersucht und mit Normalzellen verglichen. Nach einer subletalen Hyperthermieexposition von 41,8 °C für 3 Stunden wiesen durchflusszytometrisch nur maligne Zellen (Larynxkarzinom, verschiedene Sarkomzelllinien), nicht jedoch Normalzellen (PBL, Fibroblasten) eine signifikante Expression von HSP72 auf der Zelloberfläche auf. Diese Beobachtung konnte durch Western-Blots von separierten Membranfraktionen und Immunpräzipitationen mit einem HSP72-spezifischen Antikörper belegt werden [125].

In weiteren Untersuchungen konnten Multhoff et al. an Sarkomzellen demonstrieren, dass die Hyperthermie-induzierte Membranexpression von HSP72 mit einer signifikant erhöhten Lyse durch Interleukin-2 stimulierte NK-Zellen einherging. Die erhöhte Sensitivität gegenüber NK-Zellen war inhibierbar, wenn die Zielzellen nach Präinkubation mit einem anti-HSP72-Antikörper spezifisch blockiert waren [126].

Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass das Protein HSP72 eine immunogene Determinante für IL-2 stimulierte NK-Zellen enthält. Der Mechanismus der HSP72-vermittelten NK-Sensibilisierung konnte durch dieselbe Arbeitsgruppe auch an anderen Zelllinien (K562-Erythroblastom, CX7-Kolonkarzinom und LX-1-Lungenkarzinom) bestätigt werden [27,128,129]. Die Membranexpression von HSP72 konnte in weiteren Studien auch basal, d.h. ohne Hyperthermieexposition, an Biopsiematerial verschiedener Primärtumoren, u.a. an Pankreas-, Bronchial- und kolorektalen Karzinomen, nicht jedoch an Mammakarzinomen, nachgewiesen werden [67]. Weitere Untersuchungen erbrachten Hinweise darauf, dass das Stressprotein HSP72 auch eine Wirkung als Zytokin auf die Proliferation und zytolytische Aktivität von NK-Zellen ausübt [132].

Für die Therapie des NZK ist die basale oder auch stressinduzierte HSP72-Oberflächenexpression und damit verbundene Sensibilisierung gegenüber NK-Zellen potentiell von Bedeutung. Bei der systemischen Immuntherapie des metastasierten NZK nimmt Interleukin-2 eine wesentliche Stellung ein. Interleukin-2 wird biologisch wirksam über die Initiation sekundärer und tertiärer Effekte, die letztendlich zur Aktivierung von spezifisch wirksamen zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen führen. Philipps und Lanier konnten schon sehr frühzeitig zeigen, dass die IL-2 vermittelte Generation zytotoxischer Zellen (LAK-Zellen) in vitro auf eine Aktivierung von NK-Zellen (CD3-, CD56+) zurückzuführen war, während CD3+ T-Lymphozyten nur zu einem geringen Teil an der Herausbildung des LAK-Phänomens beteiligt waren [147]. Mehrere Autoren beschrieben, dass nach IL-2- oder IFN- $\alpha$ -Therapie in vivo die numerische Expansion von Zellen mit NK-Phänotypie mit dem Therapieansprechen korreliert werden konnte und in vitro eine Erhöhung des Lysevermögens von NK-Zellen zu verzeichnen war [11,33,118,145,166].

Auf der Basis dieser experimentellen Befunde wird vermutet, dass auch beim Nierenzellkarzinom, als einem immunologischen Modelltumor, HSP72 basal oder nach Hyperthermieexposition auf der Zelloberfläche exprimiert werden könnte. Es soll daher in den Untersuchungen die Membranexpression des induzierbaren HSP72 an Zelllinien und primärkultivierten Nierenkarzinomzellen im Vergleich zu Normalzellen analysiert werden. Weiterhin soll in Lyseexperimenten geprüft werden, ob die Oberflächenpräsenz von HSP72

an Zelllinien unterschiedlicher HSP72-Membranexpression mit der Lyseaktivität IL-2 stimulierter NK-Zellen korreliert werden kann und sich folglich die Beobachtungen von Multhoff et al. nachvollziehen lassen.

#### Zytoplasmatische Expression des induzierbaren 72 kDa Hitzeschockproteins

In einer Reihe experimenteller aber auch klinischer Studien konnte der Einfluss von HSP72 auf biologische Eigenschaften maligner Tumoren belegt werden. Dabei wurde häufig die basale intrazelluläre Akkumulation von HSP72 untersucht oder modifiziert und mit anderen Parametern korreliert. Eine konstitutive, basale Expression von HSP72 konnte an verschiedenen Tumoren, u.a. Ovarialkarzinom, Bronchialkarzinom, Chondro- und Osteosarkom, Plattenepithelkarzinom, Melanom sowie am NZK nachgewiesen werden [20,26,94,98,99,149,165,194,195].

Trieb et al. konnten an Chondrosarkomen zeigen, dass eine geringe intrazelluläre Expression von HSP72 mit einer niedrigen Differenzierung (G3) und damit formal mit einer schlechteren Prognose assoziiert war [195]. In einer weiteren Studie wiesen die Autoren nach, dass HSP72-negative Osteosarkome schlechter auf eine adjuvante Chemotherapie ansprachen als HSP72-positive Karzinome [194]. Auf zellulärer Ebene konnten Musch et al. am Kolonkarzinom zeigen, dass eine erhöhte basale HSP72-Expression mit einem selektiven Überlebensvorteil der Tumorzellen assoziiert war [134]. In einer anderen Studie an malignen und benignen epithelialen Ovarialtumoren war die HSP72-Expression signifikant stärker bei malignen Veränderungen ausgeprägt und eine intensive immunzytochemische Färbung mit einem geringeren Grading verbunden [9].

Es gibt eine Reihe von Beobachtungen, die auf einen potentiellen Zusammenhang zwischen der Expression von HSP72 und der immunogenen Eigenschaften maligner Tumoren hinweisen. Neben der Oberflächenexpression von HSP72 und der damit assoziierten erhöhten in vitro Lyse durch IL-2-stimulierte NK-Zellen sprechen zusätzliche Befunde auch für eine T-Zell-vermittelte anti-Tumor-Reaktivität:

- Eine Punktmutation des HSP70-2-Gens in einem primären NZK führte zu einer Erkennung des mutierten Epitops durch spezifische zytotoxische Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten [60].
- In vitro konnte ein Zusammenhang zwischen der induzierten HSP70-Expression und der Aktivierung von Subpopulationen tumorinfiltrierender T-Lymphozyten hergestellt werden [190,209].

- Die Überexpression von HSP70 in Melanomzellen, die basal eine geringe MHC-Präsentation aufwiesen, führte zu einer Verstärkung der MHC-Expression und verbesserten Präsentation antigener Peptide [84].
- Die aus Tumorzellen aufgereinigten HSP und mit ihnen assoziierten Peptide induzierten eine potente T-Zell-Antwort [29,30,35,84].

Beim NZK ist die zelluläre Expression von HSP72 an Zelllinien und primären Karzinomen untersucht worden. Dabei zeigte sich, dass Tubuluszellen HSP72 basal exprimieren und Karzinome ein heterogenes Expressionsmuster aufwiesen [20,98,165]. Aus zwei dieser Studien ließen sich jedoch auf Grund geringer Fallzahlen, abweichender Untersuchungsziele und der verwendeten Antikörper (zum Teil Messung der konstitutiven und induzierbaren Expression) keine prognostischen Aussagen ableiten. Lediglich Santarosa et al. beobachteten immunzytochemisch an Einzelzellsuspensionen primärer NZK-Kulturen einen Zusammenhang zwischen einer geringen HSP72-Expression und einer Progression der Erkrankung und verwiesen damit auf die potentielle prognostische Bedeutung der HSP72-Expression beim NZK [165]. Aus den Arbeiten ergab sich die Zielstellung, die zelluläre HSP72-Expression immunhistochemisch an Paraffinpräparaten primärer NZK und deren Metastasen am eigenen Patientengut nachzuweisen und die prognostische Bedeutung des Proteins in einer multivariaten Analyse zu prüfen.

#### *Bedeutung von HSP-Peptid-Komplexen für Vakzinationskonzepte beim Nierenzellkarzinom*

Die Bedeutung der HSP im Rahmen der Immunantwort ergibt sich durch ihre Rolle bei der Prozessierung und der Präsentation antigener Peptide, ihren immunologischen Signalcharakter und ihre Beteiligung bei der Erkennung von Tumorzellen durch immunologische Effektorzellen [130].

Auf der Fähigkeit der HSP, an der Herausbildung einer Immunantwort zu partizipieren und auf verschiedenen Ebenen mit den immunologischen Effektorsystemen zu kooperieren, begründet sich das zunehmende Interesse für die Ausnutzung dieser Eigenschaften im Rahmen spezifisch wirksamer Immuntherapien.

Die ersten Untersuchungen zu einer gezielten Anwendung von HSP für Vakzinationen in murinen Tumormodellen gehen auf die Arbeiten von Srivastava et al. am Meth A-Fibrosarkom von BALB/c-Mäusen zurück [175,176]. Das Prinzip der Vakzination mit Stressproteinen beruht auf den Peptidbindungseigenschaften vornehmlich von gp96 und HSP70. Die beiden HSP's

binden im Rahmen ihrer Beteiligung an der zellulären Protein- und Peptidprozessierung ein breites Spektrum intrazellulärer Peptide. Die protektive, antitumorale Wirkung der aus Tumorzellen gewonnenen HSP-Peptid-Komplexe wird auf die Bindung von tumorspezifischen, antigenen Peptiden an HSP70 und gp96 zurückgeführt. Diese werden letztlich für die Auslösung einer Immunreaktion verantwortlich gemacht, während HSP70 und gp96 eine Funktion als Adjuvant zugute geschrieben wird.

Der Mechanismus der HSP-Peptid-Vakzinen mit Auslösung einer zytotoxischen T-Zell-Reaktion setzt eine Reihe notwendiger Schritte der Prozessierung voraus:

1. Die Bindung und Aufnahme der HSP-Peptid-Komplexe bzw. der Peptide durch APC.
2. Den Transport, die Aufnahme und die Prozessierung im Zytosol und endoplasmatischen Retikulum (ER).
3. Die Präsentation auf MHC-I-Molekülen.
4. Die Induktion von zytotoxischen Effektorzellen.

Die Beteiligung von HSP70 bei der Auslösung einer Immunantwort wurde durch verschiedene Beobachtungen untermauert. Die Induktion von HSP72 in murinen B16 Melanomzellen führte *in vivo* zur Generation einer potenten Immunreaktion. Diese beinhaltete eine Infiltration des Tumors durch T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen (DC), eine Th1-charakteristische Zytokinfreisetzung und eine verstärkte Antigenaufnahme durch unreife antigenpräsentierende Zellen (APC) [191].

Des Weiteren zeigte sich *in vitro*, dass HSP70 und gp96 an den etablierten Ovalbumin-(OVA)- und  $\beta$ -Galaktosidase-Antigensystemen bei OVA- und  $\beta$ -gal-spezifischen T-Zellklonen die Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  als Zeichen einer Aktivierung auslösen konnten. Antigen-(Peptid)-freies HSP70 und gp96, die aus normalen Lebergewebe von Mäusen isoliert wurden, waren *in per se* der Lage, antigenspezifisch CD8-positive T-Zellen zu stimulieren. Diese Immunstimulation war abhängig von APC, jedoch unabhängig von MHC-Klasse-I-Molekülen [29].

Es gibt erste Hinweise, dass HSP-Peptid-Komplexe an APC (Monozyten bzw. dendritischen Zellen) über spezifische Rezeptoren binden und über Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert werden können. Dies wurde zunächst an der Monozytenzelllinie P388D1 und an der dendritischen Zelllinie D2SC/1 gezeigt. Es fand sich zusätzlich eine Koloalisation von aufgenommenen Peptiden und MHC-I-Molekülen in endosomalen Strukturen [7]. Die wichtige Rolle der APC wurde durch die Beobachtung unterstrichen, dass die Immunisierung mit HSP-Peptid-Komplexen funktionsfähige APC erfordert, um eine Immunantwort zu induzieren [199].

Obwohl HSP70-gekoppelte Peptide eine Immunantwort induzieren und als Vakzine genutzt werden können, ist die Rolle, die HSP70 beim Prozessierung antigener Peptide im Zytosol spielt, noch nicht ausreichend definiert. Kürzlich konnte am etablierten OVA-Antigensystem gezeigt werden, dass zytosolisches HSP70 der OVA-transfektierten Zelllinie EG7.OVA eine Assoziation mit dem H-2K<sup>b</sup> restringierten SIINFEKL-Epitop dieser Zellen aufwies. Nach Peptidstripping und HPLC konnten die entsprechenden HPLC-Fractionen an identischer Position und bei identischen Acetonitrilkonzentrationen wie synthetisches SIINFEKL eluiert und RMA-Targetzellen gegenüber dem H-2K<sup>b</sup>/SIINFEKL-spezifischen T-Zellklon 4G3 sensibilisiert werden [30]. Dies bedeutet, dass neben dem im ER lokalisierten gp96, auch zytosolisches HSP70 Komplexe mit antigenen, MHC-bindenden Epitopen bilden kann.

Versuche mit radioaktiv-markierten Peptiden haben demonstriert, dass an der für die Bindung von gp96 mit Peptiden im ER erforderlichen Überwindung der ER-Membran der TAP- (Transporter associated with antigen Processing)-Komplex beteiligt ist [103].

Der letzte Schritt nach der Prozessierung im ER und der Kopplung an MHC-Klasse-I Moleküle ist die Präsentation auf der Zelloberfläche, Erkennung durch CD8-positive T-Lymphozyten mit Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Reaktion [176,186].

Aus tierexperimentellen Untersuchungen mit HSP-Peptid-Vakzinen ließen sich folgende Beobachtungen ableiten:

1. Die Vakzination mit HSP-Peptid-Komplexen ist tumor(antigen)-spezifisch und dosisabhängig [197,199].
2. Die Tumorregression im Tiermodell wird durch Tumorpeptide vermittelt; Tumor-HSP allein bzw. nicht-Tumor-HSP induzieren keine Tumorregression [186,197].
3. Das im ER lokalisierte gp96 und das zytosolische HSP70 induzieren die Auslösung einer vergleichbar starken Immunantwort [198].
4. Die Vakzination mit HSP-Peptid-Komplexen induziert eine potente MHC-Klasse-I restringierte CD8-T-Zellreaktion [198,199].

Auf dieser Basis wurden in weiteren Studien HSP70- und gp96-Peptid-Vakzinen hinsichtlich ihres Wirksamkeitsspektrums und ihrer spezifischen Wirkungsweise in zahlreichen Untersuchungen an verschiedenen murinen Tumormodellen überprüft, u.a. dem D122-Lungenkarzinom, dem Kolonkarzinom CT26, dem Fibrosarkom Meth A, den Melanomen B16 F10.2 und F10.9, dem UV-induzierten Spindelzellkarzinom UV6139, und dem Dunning G Prostatakarzinom der Ratte [90,188]. In diesen Studien konnte die Wirksamkeit von gp96- bzw. HSP70-Peptid-Komplexen auch an präexistenten Tumoren oder Metastasen demonstriert werden

und damit das Modell der HSP-Peptid-Vakzinen nicht nur für prophylaktische Immunisierungen, sondern auch auf immuntherapeutische Ansätze bei etablierter Metastasierung erweitert werden. Bei der klinischen Anwendung von HSP70-basierten Peptidvakzinen macht man sich die Fähigkeit von HSP70 zunutze, intrazelluläre Peptide, darunter auch antigene Tumorpeptide zu binden. Die Anwendung solcher HSP-Peptid-Vakzinen setzt jedoch die Aufreinigung von HSP-Peptid-Komplexen aus den jeweiligen Primärtumoren voraus.

Die Beteiligung von HSP70 bei der Prozessierung und Stabilisierung von Peptiden und Proteinen ist ATP abhängig. HSP70 bindet die Nukleotide ADP und ATP eng und besitzt eine schwache endogene ATPase-Aktivität [106,143,210]. Man geht davon aus, dass es unter Stressbedingungen mit dem Abfall der zellulären ATP-Konzentration zu einer verstärkten Bindung von HSP70 und ADP kommt. HSP70-ADP-Komplexe weisen eine hohe Affinität zu Peptiden und destabilisierten, entfalteten Proteinen auf. Unter Stressbedingungen kann so durch die HSP-Bindung eine Stabilisierung und Protektion zellulärer Protein- und Peptidstrukturen erreicht werden. Bei ansteigenden ATP-Konzentrationen in der zellulären Erholungsphase nach Stressexposition erfolgt dann Freisetzung der HSP70-gebundenen Proteine und Peptide unter ATP-Hydrolyse [143]. Die Inkubation von HSP70 mit ATP kann folglich ausgenutzt werden, um HSP70 in reiner Form, ohne gebundene Peptide und Proteine, zu isolieren.

Aus diesen Beobachtungen ergab sich im Gegenzug für die vorliegende Arbeit die Zielstellung, mit einer ADP-Inkubation HSP70 möglichst maximal mit Peptiden aus dem Lysat von Tumorzellen zu beladen und anzureichern. Dazu soll die Methode der ADP-Affinitätschromatographie zur Anwendung kommen. Die angereicherten HSP-Peptid-Komplexe können als Ausgangsbasis für weitere Analysen der Peptidstruktur oder als Quelle zur Anwendung in HSP70-basierten Vakzinen fungieren.



## **2. Aufgabenstellung**

Die systemische Immuntherapie des metastasierten NZK basiert auf der Anwendung der rekombinanten Zytokine IL-2 und IFN- $\alpha$ 2a. Aufgrund der unzureichenden und zum Teil kontroversen Literaturdaten, sowie dem Mangel an prospektiv-randomisierten Phase-III-Studien konnte bisher kein gültiger Standard für die Therapie des metastasierten NZK definiert werden. In Deutschland werden die Zytokine IL-2 und IFN- $\alpha$ 2a häufig kombiniert und gemeinsam mit intravenös appliziertem 5-FU sowie oral verabreichter 13-CRA angewendet. Die Chemoimmuntherapie stellt einen de facto Standard der Behandlung des metastasierten NZK dar.

Im klinischen Teil der vorliegenden Monographie soll die Effektivität der Chemoimmuntherapie bei einer Gruppe von 107 Patienten mit einem metastasierten NZK, die im Zeitraum von April 1993 bis Dezember 2001 an der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Charité behandelt wurden, analysiert werden.

Es soll geprüft werden, in welchem Prozentsatz und mit welcher Dauer durch eine Chemoimmuntherapie objektive Remissionen und Stabilisierungen der Erkrankung erzielt werden können. Des Weiteren soll untersucht werden, welchen Einfluss die Chemoimmuntherapie auf das mediane Gesamtüberleben der Patientengruppe hat und ob sich ein Zusammenhang zwischen Ansprechen auf die Therapie und Überlebenszeit nachweisen lässt. Die Identifikation klinischer Faktoren, die die Prognose der Patienten signifikant beeinflussen, ist ein weiterer Schwerpunkt der Auswertung der Patientendaten. Mit uni- und multivariaten Analysen sollen tumor- und patientenbezogene Faktoren hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung geprüft werden.

Durch die Analyse verschiedener Untergruppen von Patienten sollen weitere Fragestellungen beantwortet werden:

1. Es soll untersucht werden, ob ein zusätzlicher therapeutischer Vorteil der Vierfachkombination unter Zugabe von 13-CRA gegenüber der Dreifachtherapie von IL-2, IFN- $\alpha$ 2a und 5-FU bei Patienten mit einem Karnofsky-Performance-Index von über 80 % besteht. Auch bei diesen beiden Untergruppen von Patienten soll die Auswertung hinsichtlich Ansprechraten und Überlebensanalysen erfolgen.
2. An der prognostisch ungünstigen, häufig symptomatischen Subgruppe von Patienten mit Skelettmetastasen oder inoperablen lokalen Rezidiven sollen die Ergebnisse des kombinierten Behandlungskonzeptes von Chemoimmuntherapie und synchroner Bestrahlung retrospektiv analysiert werden. Es soll abgeleitet werden, ob die Ergebnisse die

experimentellen und präliminären klinischen Daten zum Synergismus von Immuntherapie und synchroner Bestrahlung prinzipiell untermauern.

3. Bei einer weiteren Gruppe von 24 Patienten mit venösen Tumorthromben des NZK in der Vena cava inferior im Stadium III oder IV nach Staehler sollen die perioperativen Daten ausgewertet werden. Das postoperative Überleben der Patienten soll ermittelt, mit einer Kontrollgruppe verglichen, und damit untersucht werden, inwieweit die Überlebenszeit die risikoreiche und technisch anspruchsvolle operative Behandlung dieser Patientengruppe gerechtfertigt. Mit einer multivariaten Analyse kann der prognostische Einfluss venöser Tumorthromben der Stadien III oder IV nach Staehler auf das Überleben der Patienten geprüft werden.
4. In weiteren Studien werden verschiedene urologische Tumorentitäten (Prostatakarzinom, Urothelkarzinom, NZK) und die benigne Prostatahyperplasie (BPH) bezüglich der prätherapeutischen Expression des biologischen Markers TU M2-PK im peripheren Blut der Patienten untersucht. Hier soll zunächst geklärt werden, inwieweit die TU M2-PK als diagnostischer Marker dieser Erkrankungen geeignet ist. In einer zweiten Untersuchungsserie soll die Bedeutung des Parameters zur Verlaufskontrolle bei Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen unter Chemoimmuntherapie analysiert werden. Es soll die Fragestellung beantwortet werden, inwieweit durch Messung der TU M2-PK die Nachbeobachtung der Patienten mit bildgebenden Verfahren gegebenenfalls ersetzt werden kann.

Der experimentelle Teil der Monographie beschäftigt sich als Weiterentwicklung des immuntherapeutischen klinischen Konzeptes mit der immunologischen Rolle der 70 kDa Hitzeschockproteine beim NZK. Das NZK gilt wegen seiner immunogenen Eigenschaften als ein Modellkarzinom zur Beurteilung innovativer immunologischer Therapiekonzepte. Die klinische Etablierung spezifisch wirksamer Vakzinen zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms ist dabei von zentraler Bedeutung.

HSP sind durch ihre Beteiligung an der Peptidprozessierung, Bindung von Peptiden in malignen Zellen und ihre immunologische Signalfunktion potentiell bedeutsam für Vakzinationskonzepte. Hierbei spielt HSP72 eine besondere Rolle. Unter der Hypothese, dass die HSP72-Expression in enger Beziehung zu den biologischen Eigenschaften von Nierenkarzinomen steht, ist es Ziel der experimentellen Untersuchungen, die Expression von HSP72 im Zytoplasma und auf der Zellmembran beim NZK zu analysieren. In einem weiteren Schritt soll eine Methode etabliert

werden, mit der sich HSP70-Peptid-Komplexe für Vakzinationszwecke und Peptidanalysen anreichern lassen.

Dabei soll wie folgt vorgegangen werden:

1. Zunächst wird an der NZK-Zelllinie ACHN und der Prostatakarzinomlinie PC-3 die stressinduzierte HSP72-Membranexpression untersucht. Durch in vitro zellvermittelte Lyseexperimente soll anschließend geprüft werden, ob die potentielle HSP72-Membranexpression mit einer erhöhten Lyse durch IL-2 stimulierte NK-Zellen korreliert. In weiteren Untersuchungen sollen dann primärkultivierte NZK-Zellen hinsichtlich ihrer basalen und stressinduzierten HSP72-Membranexpression durchflusszytometrisch analysiert werden. Die Untersuchungen sollen, im Einklang mit Literaturbefunden zu anderen Tumorentitäten, Aufschluss zum Phänomen und der prognostischen Bedeutung der HSP72-Oberflächenexpression beim NZK geben.
2. Im zweiten Teil der experimentellen Arbeiten soll die prognostische Bedeutung der basalen zytoplasmatischen HSP72-Expression untersucht werden. Präliminäre Literaturbefunde weisen auf den prognostischen Einfluss der HSP72-Expression bei verschiedenen Tumorentitäten und einen Zusammenhang zwischen HSP72-Expression und tumorimmunologischen Eigenschaften hin. Die zytoplasmatische HSP72-Expression soll mit einer immunhistochemischen Analyse an Paraffinschnitten von Patienten mit lokalisierten und metastasierten NZK untersucht und anschließend mit uni- und multivariaten Analysen ausgewertet werden.
3. Es soll eine Methode zur Anreicherung von HSP70-Peptid-Komplexen aus Tumorzellen entwickelt werden, die auf der ADP-Bindungsfähigkeit von HSP70 beruht. Die angereicherten Komplexe können für Vakzinen und zur Identifizierung HSP-gebundener biologisch aktiver Peptide genutzt werden.

Die tumorimmunologische Funktion der Hitzeschockproteine steht heute im Mittelpunkt vieler wissenschaftlicher Forschungsprojekte. Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen sollen die Kenntnisse über die Rolle insbesondere der 70 kDa HSP beim NZK vertiefen und damit als Basis für die klinische Ausnutzung spezifischer immunologischer Eigenschaften der HSP unter prognostischen und therapeutischen Aspekten dienen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Chemoimmuntherapie**

##### **3.1.1 Patientengut**

Zwischen April 1993 und Dezember 2001 wurden 107 Patienten mit einem metastasierten NZK, die mit einer Chemoimmuntherapie behandelt worden waren, hinsichtlich der Ansprechraten und dem klinischen Verlauf retrospektiv analysiert. Das mediane Alter der 23 Frauen und 84 Männer betrug 58 Jahre (35 bis 73 Jahre). Alle Patienten hatten eine progressive metastatische Erkrankung. Es wurden nur Patienten ausgewertet, bei denen vorher eine Tumornephrektomie durchgeführt worden war. Die TNM-Klassifikation ergab 3 pT1, 21 pT2, 28 pT3a, 39 pT3b, 1 pT3c und 5 pT4 Karzinome. Bei 10 Patienten war die T-Kategorie nicht bekannt. Bei 19 Patienten wurde zum Zeitpunkt der Operation ein Lymphknotenbefall (pN+) diagnostiziert. Das Grading des Primärtumors war in 2 Fällen G1, in 64 Fällen G2, in 31 Fällen G3 und in 2 Fällen G4. Das Grading war bei 8 Patienten nicht bekannt. Die histologischen Befunde ergaben hellzellige Nierenzellkarzinome bei 59 Patienten. Des Weiteren wurden bei 7 Patienten sarkomatoide, bei 3 Patienten papilläre und bei einem Patienten ein chromophobes NZK festgestellt. Bei den anderen 37 Patienten war der histologische Subtyp nicht bekannt.

Bei insgesamt 68 Patienten lag eine Vorbehandlung vor. 42 Patienten wiesen in der Anamnese eine operative Metastasenentfernung auf. 7 Patienten waren vor Chemoimmuntherapie perkutan bestrahlt worden und 19 Patienten hatten bereits eine Immuntherapie mit einem anderen Therapieschema erhalten.

Von den 107 Patienten wurden 45 mit einer synchronen Metastasierung diagnostiziert. Bei 62 Patienten war die Metastasierung metachron nach einem Zeitintervall von 23 Monaten (3 bis 150 Monate).

Bei 36 der 107 Patienten (33,6 %) lag eine Metastasierung in einem Organsystem vor. Weitere 36 Patienten (33,6 %) wiesen einen metastatischen Befall von zwei Organsystemen und 35 Patienten (32,8 %) einen Befall von drei Organsystemen auf. Lungenmetastasen traten bei 81 Patienten (76 %) auf, gefolgt von Knochenmetastasen bei 25 Patienten (23 %) und Lebermetastasen bei 23 Patienten (21 %). Mediastinale Lymphknotenmetastasen traten bei 25 Patienten (23 %) und retroperitoneale Lymphknotenmetastasen bei 16 Patienten (15 %) auf. 19 Patienten (18 %) hatten lokale Rezidive. Andere Metastasenlokalisationen bei 38 Patienten (35 %) waren die Nebennieren, die kontralaterale Niere, die Pleura, die Schilddrüse oder das Peritoneum. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6) Patientencharakteristika

107 Patienten	
medianes Follow-up	20 Monate
medianes Alter	58 Jahren (35 – 75)
weiblich : männlich	23 : 84
synchron : metachron	45 : 62
Tumornephrektomie	alle Patienten
Lymphknotenbefall	19 (17.7 %)
Grading $\geq$ G 3	31 (29 %)
KPI $\geq$ 80 %	21 (20 %)
metastasierte Organsysteme:	
eins	36 (33.6 %)
zwei	36 (33.6 %)
drei oder mehr	35 (32.8 %)
Metastasenlokalisation:	
Lungen	81 (76 %)
Skelett	25 (23 %)
Leber	23 (21 %)
Nebennieren	10 (9 %)
Pankreas	8 (7 %)
kontralaterale Niere	8 (7 %)
Lymphknoten (hilär, mediast.)	25 (23 %)
Lymphknoten (retroperitoneal)	16 (15 %)
Lokalrezidiv	19 (18 %)
andere	12 (11 %)

### 3.1.2 Therapieplan

Die Patienten erhielten die Chemoimmuntherapie überwiegend im Rahmen prospektiver Therapieprotokolle der Deutschen Gesellschaft zur Chemoimmuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms (DGCIN). Das Therapieprotokoll entspricht dem de facto Standard in Deutschland. Die Patienten waren über das Behandlungsprotokoll und die entsprechenden Nebenwirkungen aufgeklärt und hatten ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Chemoimmuntherapie bestand aus bis zu 3 aufeinanderfolgenden 8wöchigen Zyklen von subkutan appliziertem IL-2, subkutan appliziertem IFN- $\alpha$ 2a und intravenös appliziertem 5-FU. Ein Teil der Patienten erhielt zusätzlich peroral 13-cis-Retinsäure (13-CRA). Zwischen den Therapiezyklen wurde den Patienten eine drei- bis vierwöchige Erholungsphase gewährt.

Der Therapieplan ist in Tabelle 7 dargestellt. In der ersten Zyklushälfte wurden IL-2 und IFN- $\alpha$ 2a kombiniert. IL-2 wurde an den Tagen 3, 4 und 5 der Wochen 1 und 4 in einer Dosierung von

zweimal 18 Mio IU täglich und an den Tagen 1, 3 und 5 der Wochen 2 und 3 in einer Dosierung von 9 Mio IU verabreicht. IFN- $\alpha$ 2a wurde am Tag 1 der Wochen 1 und 4 und an den Tagen 1, 3 und 5 der Wochen 2 und 3 in einer Dosierung von 9 Mio IU gegeben. In der zweiten Zyklushälfte wurden IFN- $\alpha$ 2a und 5-FU kombiniert. In den Wochen 5 bis 8 erhielten die Patienten IFN- $\alpha$ 2a in einer Dosis von 18 Mio IU jeweils an den Tagen 1, 3 und 5. 5-FU (750 mg/kg KG) erhielten die Patienten als 30minütige Kurzinfusion jeweils am ersten Tag der Wochen 5 bis 8. Insgesamt 71 Patienten erhielten während jedes Zyklus an allen Tagen peroral 3 x 20 mg 13-CRA.

Um die Nebenwirkungen der Chemoimmuntherapie zu minimieren erhielten die Patienten eine Begleitmedikation, wie z.B. Paracetamol gegen Fieber, Metoclopramid gegen Übelkeit und Erbrechen oder Panthenol gegen Hautirritationen.

Die Therapie wurde abgebrochen wenn eine Progression der Erkrankung diagnostiziert wurde, wiederholt WHO Grad III/IV Toxizitäten auftraten oder die Patienten ihre Einverständniserklärung zurückzogen.

Tab. 7) Therapieplan (\* 36 Mio IU IL-2 und  $\gamma$  9 Mio IU IL-2,  $\dagger$  18 Mio IU IFN- $\alpha$ 2a und  $\ddagger$  9 Mio IU IFN- $\alpha$ 2a,  $\star$  750 mg/m<sup>2</sup> KÖF 5-FU)

Medikament	Wochen 1 und 4					Wochen 2 und 3					Wochen 5 bis 8				
	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Mo	Di	Mi	Do	Fr
IL-2			✱	✱	✱	$\gamma$		$\gamma$		$\gamma$					
IFN- $\alpha$ 2a	✱					✱		✱		✱	✧		✧		✧
5-FU											☆				
13-CRA	täglich von Mo bis So					täglich von Mo bis So					täglich von Mo bis So				

### 3.1.3 Statistische Auswertung

Das Therapieansprechen wurde entsprechend der UICC Kriterien und basierend auf den radiologischen Untersuchungen (konventionelle Röntgendiagnostik, Computertomographie, Ganzkörperskelettszintigraphie und Magnetresonanztomographie) alle 2 ½ bis 3 Monate durchgeführt. Es wurden nur Patienten ausgewertet, die zumindest die ersten 4 Wochen des ersten Therapiezyklus absolviert hatten. Das Ansprechen wurde basierend auf den Auswertungen nach dem ersten Zyklus bewertet. Der Zeitraum des Ansprechens wurde vom Beginn der

Chemoimmuntherapie bis zum Zeitpunkt des Progresses bzw. zum Stichtag 30.06.2002 berechnet. Nebenwirkungen der Therapie wurden anhand der Patientenangaben während des stationären Aufenthaltes und der ambulanten Dispensairebetreuung erfasst.

Das Überleben der Patienten wurde vom Beginn der Therapie bis zum Zeitpunkt des Todes bzw. bis zum Zeitpunkt des Stichtages 30.06.2002 berechnet. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde anhand der Kaplan-Meier-Methode berechnet und Gruppen wurden mit dem Log-Rank-Test verglichen [91,110]. Die Identifikation unabhängiger Prognosefaktoren erfolgte mittels multivariater COX-Regressionsanalyse unter Anwendung des Software-Programms SPSS (Scientific Package for Social Science, version 11.0 for Windows, SPSS, Chicago, IL, USA).

### **3.2 Chemoimmuntherapie und synchrone Bestrahlung**

#### **3.2.1 Patientengut**

Zwischen Juni 1998 und Oktober 2001 wurden 20 Patienten, darunter 5 Frauen und 15 Männer, synchron mit einer Chemoimmuntherapie und perkutanen Bestrahlung behandelt und retrospektiv analysiert. Die Patienten waren alle tumornephrektomiert und hatte eine progrediente metastasierte Erkrankung. Die T-Kategorie ergab kein pT1-Karzinom, 5 pT2-, 14 pT3- und 1 pT4-Karzinom. Bei 4 Patienten lag ein Lymphknotenbefall zum Zeitpunkt der Operation vor. 13 Patienten hatten ein G2- und 7 Patienten hatten eine G3-Karzinom. Bei 12 Patienten ergab der histologische Befund ein hellzelliges Karzinom und bei weiteren 4 Patienten ein sarkomatoides Karzinom. Bei 4 Patienten war der histologische Subtyp nicht bekannt.

8 Patienten hatten eine synchrone Metastasierung und bei 12 Patienten traten die Metastasen metachron, nach einem Median von 22 Monaten (2 bis 54 Monate) auf.

Von den 20 Patienten wiesen 2 (10 %) eine Metastasierung in einem Organsystem auf, bei 7 Patienten (35 %) waren zwei Organsysteme und bei 11 Patienten (55 %) waren drei und mehr Organsysteme befallen. Lungenmetastasen traten bei 15 Patienten (75 %) auf, gefolgt von Skelettmetastasen bei 12 Patienten (60 %) und Lymphknotenmetastasen bei ebenfalls 12 Patienten (60 %), Nebennierenmetastasen bei 3 Patienten (15 %) und Lebermetastasen bei 2 Patienten (10 %).

Bei 16 Patienten lagen Symptome wie Schmerz oder Kompressionssymptome (z.B. neurologische Symptome, Subileus) vor, die durch Skelett- und Lymphknotenmetastasen oder lokale Rezidive bedingt waren.

Die Patienten wurden in 2 Gruppen eingeteilt. Die 11 Patienten der Gruppe 1 erhielten die kombinierte Therapie als „First-line“-Therapie, die anderen 9 Patienten der Gruppe 2 erhielten

die Therapie in einem „Second-line“-Konzept nach stattgehabter alleiniger Chemoimmuntherapie.

### **3.2.2 Therapieplan**

Die Patienten erhielten das DGCIN-Standardprotokoll unter Verwendung von subkutanem IL-2, subkutanem IFN- $\alpha$ 2a, intravenösem 5-FU und peroraler 13-CRA in bis zu drei aufeinanderfolgenden Zyklen. Das Behandlungsprotokoll ist in Tabelle 7, Seite 25 dargestellt. Die Therapie wurde beendet, wenn eine Progression der Erkrankung festgestellt wurde, wiederholt Nebenwirkungen nach WHO Grad III/IV auftraten oder die Patienten ihre Einverständniserklärung zurückzogen.

19 Patienten wurden mit einer perkutanen Strahlentherapie (EBRT) während des ersten Zyklus behandelt. Die EBRT wurde in Einzeldosen von 2 bis 3 Gy und einer Gesamtdosis von 30 bis 40 Gy unter Anwendung eines Linearbeschleunigers (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA) mit 6 oder 20 MV Photonen appliziert. Die Patienten erhielten entweder eine 3D-konformale Bestrahlungstherapie (3D-CRT) oder eine konventionell, in Gegenfeldtechnik geplante Behandlung.

Bei einem Patienten wurde die Bestrahlung direkt vor der Chemoimmuntherapie durchgeführt. Ein weiterer Patient wurde nach chirurgischer Stabilisierung einer pathologischen Fraktur einer Skelettmetastase bestrahlt. Neunzehn Patienten hatten noch weitere Metastasen außerhalb des Strahlenfeldes. Die Bestrahlungstherapie wurde bei 9 Patienten mit Skelettmetastasen, 7 Patienten mit Lymphknotenmetastasen und weiteren 4 Patienten mit lokalen Rezidiven durchgeführt. Zwei Patienten erhielten während der drei Zyklen Chemoimmuntherapie eine Bestrahlung an einer zweiten metastatischen Lokalisation.

### **3.2.3 Statistische Auswertung**

Das Therapieansprechen wurde entsprechend der UICC-Kriterien und basierend auf den radiologischen Untersuchungen (konventionelle Röntgendiagnostik, Computertomographie, Ganzkörperskelettszintigraphie und Magnetresonanztomographie) alle 2 ½ bis 3 Monate ausgewertet. Die Veränderung von Symptomen wurde anhand von Patientenbefragungen erfasst. Es wurde kein spezieller Symptomscore verwendet.

Die Dauer des Therapieansprechens und das Überleben der Patienten wurde vom Beginn der Therapie bis zum Zeitpunkt des Progresses oder Todes berechnet. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde anhand der Kaplan-Meier-Methode kalkuliert und die Gruppen wurden mit dem Log-Rank-Test verglichen.



### **3.3 venösen Tumorthromben der Stadien III und IV (nach Staehler)**

#### **3.3.1 Patientengut**

Im Zeitraum von Juli 1992 bis November 2000 wurden an der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Charité 24 Patienten mit Nierenzellkarzinomen mit infradiaphragmal-suprahepatischem oder supradiaphragmalem Vena-cava-Befall (Stadium III und IV nach Staehler) operiert. Das mediane Alter der 10 weiblichen und 14 männlichen Patienten betrug 59,5 Jahre (49 bis 73 Jahre) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Das mediane Follow-up betrug 23,5 Monate. Es lagen bei 13 Patienten infradiaphragmal-suprahepatische Vena-cava-Zapfen (Stadium III) und bei 11 Patienten supradiaphragmale Vena-cava-Zapfen (Stadium IV) vor. Bei 4 Patienten bestanden zum Zeitpunkt der Operation bereits Metastasen, bei 14 weiteren Patienten traten in der Nachbeobachtungszeit Metastasen (insgesamt 75 %) auf.

Als Kontrollgruppe dienten 75 Patienten mit Nierenzellkarzinomen ohne Vena-cava-Zapfen im Stadium III/IV. 11 der 75 Patienten hatten venöse Tumorthromben der Stadien I (4 Patienten) und II (7 Patienten). Aufgrund der anerkannten Meinung, dass eine Ausdehnung der Tumorzapfen im Stadium I und II keine prognostische Bedeutung besitzt, wurden diese Patienten in die Kontrollgruppe einbezogen [50,101,102,181]. Das mediane Alter aller 18 weiblichen und 57 männlichen Patienten betrug 60,0 Jahre (35 bis 74 Jahre). Das mediane Follow-up betrug 27,0 Monate. Bei 59 Patienten (79 %) bestanden bzw. entwickelten sich im weiteren Verlauf des Krankheitsgeschehens Metastasen. Damit unterschieden sich die Patienten der Kontrollgruppe in wesentlichen Merkmalen wie Alter, Follow-up und Metastasierung nicht von den Patienten mit Vena-cava-Zapfen im Stadium III und IV.

#### **3.3.2 Präoperative Vorbereitung**

Nach Einschätzung des Allgemeinzustandes erfolgte bei allen Patienten eine intensive präoperative Vorbereitung und Konditionierung. Die Diagnostik von Fernmetastasen erfolgte durch eine kraniale, thorakale und abdominelle CT und Ganzkörperskelettszintigraphie. Die Ausdehnung des Vena-cava-Zapfen wurde mittels MRT und Farbkodierter-Duplex-Sonographie der Vena cava inferior, Becken- und Beinvenen (zum Ausschluss von Appositionsthromben) und ggf. Echokardiographie ermittelt. Die kardiopulmonale und vaskuläre Einschätzung der Patienten erfolgte mittels Lungenfunktionstest, konventioneller Röntgen-Thorax-Aufnahme und Farbkodierter-Duplex-Sonographie der extrakraniellen Gefäße.

### **3.3.3 Intraoperative Technik – Vena-cava-Zapfen im Stadium III**

- einseitige Präparation von Vena axillaris und Vena femoralis
- Chevron- oder thorakoabdominale Inzision, vollständige Präparation des Darmes
- Lymphadenektomie und Tumornephrektomie mit selektiver Ligatur von Nierenarterie und Nierenvene
- Anschlingen von Ligamentum hepatoduodenale, kontralateraler Nierenvene und infra- und suprahepatischer Vena cava, vollständige Mobilisation der Leber
- Kanülierung der Venae axillaris und femoralis und Anschluss des extrakorporalen venovenösen Bypass, Abklemmen des Ligamentum hepatoduodenale (Pringle-Manöver)
- Ausklemmen der kontralateralen Nierenvene sowie der Vena cava infrarenal und suprahepatisch
- anterolaterale Cavotomie, Extirpation des Tumorthrombus und Cava-Rekonstruktion
- Freigabe des Blutstromes aus Pfortader, Nierenvene und Vena cava unter temporärer Überdruckbeatmung

### **3.3.4 Intraoperative Technik – Vena-cava-Zapfen im Stadium IV**

- Chevron- oder Mercedes-Inzision, vollständige Präparation des Darmes
- Lymphadenektomie und Tumornephrektomie mit selektiver Ligatur von Nierenarterie und Nierenvene
- Sternotomie mit Perikardinzision und orthograde Perfusion über Kanülierung des rechten Atriums und der Aorta für den kardiopulmonalen Bypass
- Anschluss an die Herz-Lungenmaschine, Hypothermie auf 20 °C und Kardioplegie
- Unterbrechung der extrakorporalen Zirkulation (95 % des Blutvolumens sind in der Herz-Lungenmaschine)
- nach Atriotomie (Kardiochirurg) und Cavotomie (Urologe) bei nahezu kompletter Blutleere Extirpation des Tumorthrombus
- Verschluss des Atriums, Rekonstruktion der Vena cava und Beginn der Aufwärmphase

### **3.3.5 Postoperatives Management**

Die Patienten wurden postoperativ auf der Intensivstation überwacht. Bei unkompliziertem Verlauf wurde ab 2. postoperativem Tag mit Kostaufbau und progressiver Mobilisation begonnen. Die Drainage-Entfernung erfolgte in der Regel am 3. oder 4. postoperativen Tag. Die Entlassung der Patienten in die ambulante Nachsorge erfolgte nach einem medianen stationären Aufenthalt von 29 Tagen (14 bis 35 Tage).

### **3.3.6 Chemoimmuntherapie**

Bei insgesamt 7 von 18 metastasierten Patienten der Gruppe mit Vena-cava-Zapfen und 41 von 59 metastasierten Patienten der Kontrollgruppe wurde eine Chemoimmuntherapie nach dem Standardprotokoll der DGCIN unter Anwendung von subkutanem IL-2, subkutanem IFN- $\alpha$ 2a und intravenösem 5-FU entsprechend des Protokolls (dargestellt in Tabelle 7, Seite 25) durchgeführt.

### **3.3.7 Statistische Auswertung**

Das Überleben der Patienten mit Vena-cava-Zapfen und der Vergleichsgruppe wurde ab Operationszeitpunkt berechnet. Bei Patienten mit Vena-cava-Befall und Metastasen erfolgte die Berechnung ab dem Zeitpunkt des Auftretens von Fernmetastasen. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Log-Rank-Test ermittelt. Die Identifikation unabhängiger Prognosefaktoren erfolgte mittels multivariater COX-Regressionsanalyse unter Anwendung des Software-Programms SPSS (Scientific Package for Social Science, Version 11.0 for Windows, SPSS, Chicago, IL, USA).

## **3.4 Tumor M2-Pyruvatkinase (TU M2-PK)**

### **3.4.1 Patientengut**

Die Untersuchungen zur TU M2-PK erfolgten in zwei verschiedenen Serien<sup>1</sup>. Die Untersuchungen der ersten Serie erfolgten an Patienten mit verschiedenen nicht-metastasierten und metastasierten urologischen Tumoren und wurden an Heparinplasma durchgeführt. Eine Gesamtanzahl von 57 gesunden Probanden mit einem medianen Alter von 51 Jahren diente dabei als Kontrollgruppe. Die TU M2-PK wurde an Patienten mit Nierenzellkarzinomen, Urothelkarzinomen, Prostatakarzinomen und benigner Prostatahyperplasie (BPH) untersucht.

---

<sup>1</sup> Die Untersuchungen der ersten Serie erfolgten im Forschungslabor der Klinik für Urologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Jung. Die Untersuchungen der zweiten Serie wurden im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Campus Mitte, Universitätsklinikum Charité, unter der Leitung von Frau Dr. B. Brux durchgeführt.

Die Aufteilung der Patienten gestaltete sich wie folgt:

NZK	63 Patienten	51 nicht-metastasiert, 12 metastasiert,	medianes Alter 57 Jahre medianes Alter 58 Jahre
Urothelkarzinom	36 Patienten	24 nicht-metastasiert, oberflächlich, und 6 nicht-metastasiert, infiltrierend, med. Alter 61 Jahre 6 metastasiert,	medianes Alter 68 Jahre
Prostatakarzinom	58 Patienten	31 nicht-metastasiert, 27 metastasiert,	medianes Alter 61 Jahre medianes Alter 64 Jahre
BPH	28 Patienten		medianes Alter 65 Jahre

In der zweiten Serie erfolgten die Untersuchungen nur an Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen. Hierbei wurden Proben von insgesamt 68 Patienten gewonnen (9 weibliche Patienten, 59 männliche Patienten, medianes Alter 61 Jahre, 36 bis 77 Jahre). Alle Patienten waren tumornephrektomiert und die Diagnose NZK war histologisch gesichert. Bei 17 Patienten bestand lokalisiertes NZK (pT1/2), bei 42 Patienten lag ein lokal fortgeschrittenes NZK (pT3/4) vor und bei 9 Patienten konnte die initiale T-Kategorie nicht ermittelt werden. 11 Patienten wiesen primär Lymphknotenmetastasen auf. Von den 68 Patienten wiesen 2 ein hoch differenziertes NZK (G1) auf, bei 36 Patienten wurde ein mäßig differenziertes NZK (G2) diagnostiziert und bei 18 Patienten lag ein entdifferenziertes NZK (G3) vor. Bei 12 Patienten lagen keine Informationen zum Grading des Primärtumors vor.

Die Verteilung hinsichtlich der metastatisch befallenen Organsysteme verhielt sich wie folgt: 17 Patienten hatten ein befallenes Organsystem, 26 Patienten hatten Metastasen in 2 Organsystemen und 25 Patienten wiesen Metastasen in 3 oder mehr Organsystemen auf.

Die Metastasen traten bei 56 Patienten in den Lungen auf (82 %), gefolgt von retroperitonealen oder mediastinalen/hilären Lymphknotenmetastasen bei 30 Patienten (44 %), Lebermetastasen bei 22 Patienten (32 %), Knochenmetastasen bei 19 Patienten (28 %) und lokalen Rezidiven bei 7 Patienten (10 %). Zusätzlich Metastasenlokalisationen waren das Pankreas, die kontralaterale Niere, das Gehirn und die Haut.

Von den 68 Patienten hatten 24 eine synchrone Metastasierung, bei den 44 anderen Patienten trat die Metastasierung metachron nach einem medianen Intervall von 23 Monaten (6 bis 156 Monate) auf.

50 der 68 Patienten erhielten im Verlauf eine Chemoimmuntherapie laut Protokoll (siehe Tabelle 7, Seite 25). Bei 11 Patienten wurden synchron zur Chemoimmuntherapie lokale Rezidive, Lymphknotenmetastasen oder Knochenmetastasen palliativ perkutan bestrahlt. Bei 3 weiteren Patienten wurden zwischen den Chemoimmuntherapie-Zyklen Operationen von Knochenmetastasen zur Stabilisierung von drohenden Frakturen durchgeführt.

Bei 8 der 18 nicht-behandelten Patienten konnte die Therapie auf Grund einer raschen Progression mit Verschlechterung des Allgemeinzustandes nicht durchgeführt werden, 2 Patienten brachen die Therapie auf Grund von Nebenwirkungen ab und weitere 8 Patienten standen zur Nachbeobachtung nicht zur Verfügung. Bei diesen 18 Patienten konnte die TU M2-PK nicht im Verlauf bestimmt werden.

Bei den 50 Patienten, die mit einer Chemoimmuntherapie behandelt wurden, bestand ein Nachbeobachtungszeitraum von mindestens 2½ bis 3 Monaten, entsprechend einem Zyklus Chemoimmuntherapie. Bei 30 Patienten betrug die Beobachtungszeit 5 Monate entsprechend 2 Therapiezyklen. Während dieser Zeit wurden die TU M2-PK Werte in regelmäßigen Abständen analysiert und dann mit dem bildgebend-dokumentierten Behandlungsergebnis verglichen. Eine Durchuntersuchung mit Computertomographie, Ganzkörperskelettszintigraphie, Thorax-Röntgen in wie Ebenen oder Magnetresonanztomographie wurde alle 2½ bis 3 Monate durchgeführt. Die Beurteilung des Behandlungsergebnisses erfolgte nach den UICC-Richtlinien. Ein Abbruch der Therapie erfolgte, wenn die Durchuntersuchung eine Progredienz der Erkrankung ergab.

Bei den Patienten mit einer synchronen Erkrankung erfolgte die Bestimmung der TU M2-PK nach Operation des Primärtumors und vor dem Beginn der Chemoimmuntherapie. Bei den anderen Patienten wurde der Marker als Routineuntersuchung während der Nachbeobachtung bestimmt oder als Ausgangswert gemessen, wenn per bildgebender Diagnostik Metastasen diagnostiziert wurden.

### **3.4.2 Messung der TU M2-PK**

Die Proben der ersten Serie wurden als Heparinplasma gewonnen, 15 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert und dann bei – 80 °C gelagert. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit, das auf der Anwendung von zwei spezifisch bindenden monoklonalen Antikörpern basiert, die nicht mit den anderen Isoenzymen der Pyruvatkinase (M1-, M2-, L-, R-type PK) kreuzreagieren (Fa. Schebo Tech GmbH, Wettenberg, Deutschland). Die Blutproben wurden prinzipiell vor jeglichen therapeutischen Eingriffen (operative Eingriffe, Chemoimmuntherapie, Hormontherapie, Chemotherapie oder Strahlentherapie) entnommen.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen der ersten Serie erfolgte die Bestimmung der TU M2-PK in der zweiten Serie entsprechend der überarbeiteten Herstellerempfehlung aus EDTA-Plasma. Die Plasmen wurden für 15 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert und dann bei – 80 ° C gelagert. Das o.g. ELISA-Kit kam zur Anwendung. Entsprechend der Herstellerempfehlung wurde ein Cut-off von 15 kU/l benutzt.

### **3.4.3 Statistische Auswertung**

Für die Verlaufsbeurteilung wurden die initialen TU M2-PK-Werte mit den Werten der Nachbeobachtungsphase verglichen. Die statistische Auswertung beider Serien erfolgte mit dem Software-Programm GraphPad 3.0L (PRISM, San Diego, USA). Die verschiedenen Gruppen nicht-parametrischer Daten wurden mit dem MANN-WHITNEY-Test und dem nicht-parametrischen ANOVA-Test nach KRUSKAL-WALLIS verglichen.

## **3.5. HSP72-Zellmembranexpression<sup>2</sup>**

### **3.5.1 Zelllinien und Kulturbedingungen**

In den Versuchen wurden die humane Nierenkarzinomlinie ACHN (ATCC CRL-1611) und die humane, hormonunabhängige Prostatakarzinomlinie PC-3 (ATCC CRL-1435) genutzt. Die ACHN Zellen wurden in Minimum Essential Medium Eagle mit nicht-essentiellen Aminosäuren (MEM) und die PC-3 Zellen in RPMI 1640 Medium kultiviert. Die Medien enthielten 10 % FKS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), Natriumpyruvat (1 mM), L-Glutamin (2 mM) und HEPES (10 mM). Die Kultur der Zellen erfolgte in einem Zellinkubator mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 ° C.

### **3.5.2 Isolation und Kultivierung von Primärkulturen<sup>3</sup>**

Die Gewinnung der Gewebeproben erfolgte intraoperativ nach Entfernung der tumortragenden Niere während der Tumornephrektomie. Nach Eröffnen des Organs wurden aus dem präparierten Tumor etwa 4 bis 8 cm<sup>3</sup> große Stücke steril entnommen und in Transportpuffer (PBS mit Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Amphotericin B (250 µg/ml)) eingelegt

---

<sup>2</sup> Die experimentellen Arbeiten erfolgten auf der Basis eines DAAD-Stipendiums des Habilitanden an der University of New Mexico, Albuquerque, NM, USA, unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. P.L. Moseley, MD, Chief, Division of Allergy, Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine. Die weiterführenden experimentellen Untersuchungen in Deutschland wurden gesondert gekennzeichnet.

<sup>3</sup> Das Thema wurde von Herrn D. Meier im Rahmen einer Promotion bearbeitet. Die Isolation und Kultivierung der Primärkulturen erfolgte in der Forschungsabteilung der Klinik für Urologie. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden am Institut für Medizinische Immunologie, Campus Mitte, Universitätsklinikum Charité unter Mitarbeit von Herrn Dr. F. Kern durchgeführt.

und unter Kühlung in Eiswasser in die Forschungsabteilung transportiert. Die umgehende Aufarbeitung des Gewebes erfolgte in Anlehnung an die von Stephens et al. beschriebene Methode [184]. Zunächst wurden die Tumorstücke für 20 min bei 37 °C in Penicillin/Streptomycinlösung inkubiert. Danach wurde das Gewebe getrocknet, gewogen und dann mechanisch in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stückchen zerkleinert. Dann erfolgte die Inkubation des Tumorgewebes in Kollagenase (2,5 mg/ml) für 2 ½ Stunden bei 37 °C im Vertikalrüttler. Nach Zugabe von MEM-Medium und Resuspension, Zentrifugation bei 1200 U/min für 6 min, Aufnahme in 30 ml MEM-Medium und erneuter Resuspension wurde die Tumorzellsuspension steril durch Gaze filtriert. Dann wurden die gewonnenen Einzelzellen erneut resuspendiert und bei 1200 U/min für 6 min zentrifugiert. Die Elimination für Erythrozyten erfolgte durch die Resuspension in Lysepuffer (0,155 M NH<sub>4</sub>Cl, 0,01 M KHCO<sub>3</sub>, 0,0027 M EDTA, pH 7,4 mit 4 N NaOH), erneuter mehrfacher Zentrifugation bei 1200 U/min für 6 min und anschließender Aufnahme in MEM-Medium. Dann erfolgte die Kultivierung der Tumorzellen in hoher Dichte in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in einem Zellinkubator mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C. Die Reduktion von Fibroblasten konnte durch eine fraktionierte Trypsinierung erzielt werden.

### **3.5.3 Verifizierung der epithelialen Herkunft der Zellen<sup>4</sup>**

Zur Verifizierung ihrer epithelialen Herkunft wurden die Zellen immunhistochemisch mit einem anti-CK18-Antikörper (MU 143 UC, BioGenex, Hamburg, Deutschland) gefärbt und die Expression von CK18 dann mit der Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Methode visualisiert. Dazu wurden die Zellen auf Micro-Slids inkubiert, dann fixiert, gewaschen und anschließend mit einem spezifischen anti-CK18-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur gefärbt und erneut mehrfach gewaschen. Anschließend wurden die Präparate mit sekundären Ziege-anti-Maus- und Ziege-anti-Kaninchen Antikörpern (Dianova, Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase (Dianova, Hamburg, Deutschland) und die Visualisierung der CK18-Expression mit Substrat/Chromogen-Lösung (Neufuchsin/Naphtol-Biphosphat). Die Präparate wurden gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt und eingedeckt. Die semiquantitative Einschätzung der CK18-Expression erfolge wie in Abschnitt „Semiquantitative Erfassung der HSP72-Expression“, Kapitel 3.6.4 Seite 40, beschrieben.

---

<sup>4</sup> Die Untersuchungen erfolgten im Institut für Pathologie, Campus Mitte, Universitätsklinikum Charité, unter der Betreuung von Frau OÄ Dr. B. Rudolph.

### **3.5.4 Hyperthermieexposition**

Die Hyperthermiebehandlung wurde mit einem Präzisionswasserbad bei Temperaturen zwischen 41,8 bis 43,5 °C ( $\pm 0.1$  °C) für 1 bis 3 Stunden durchgeführt. Nach Hyperthermieexposition wurden die Zellen wieder in den Inkubationsschrank verlagert und dort während der Erholungsphase inkubiert. Je nach Dauer der Erholungsphase (meist 16 Stunden) wurden die Zellen dann für die geplanten Experimente weiterverwendet.

### **3.5.5 Durchflusszytometrische Untersuchungen**

Die behandelten Zellen und Kontrollzellen wurden nach den geplanten Zeitpunkten während der Erholungsphase nach Hyperthermieexposition mit HBSS gewaschen und dann mit einem Zellschaber vorsichtig abgelöst, in Medium resuspendiert und zweimal gewaschen.  $10^6$  Zellen wurden in 100  $\mu$ l RPMI aufgenommen und erneut resuspendiert und mit den primären Antikörpern für 90 min bei 4 °C inkubiert. Es wurden folgende Antikörper und Isotyp-Kontroll-Antikörper in je 50  $\mu$ l Flowzytometrielösung (PBS mit 2 % FKS und 0,1 %  $\text{NaN}_3$ ) verwendet: anti-HSP72-AK (C92F3A-5, Stressgen Corp., Victoria, BC, Kanada; IgG1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), anti-MHC-Klasse-I, (W6/32, DAKOCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland; IgG2a, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland). Dann wurde das Pellet resuspendiert, der Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus, F2650, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) dazugegeben und die Zellen für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden an einem Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) quantitativ gemessen. Die Daten wurden mit dem Programm ModFit (Verity Software, Topsham, MA, USA) analysiert. Der Prozentsatz spezifisch gefärbter Zellen wurde berechnet aus der Differenz der Anzahl positiv gefärbter Zellen minus der Anzahl isotypgefarbter der Zellen.

### **3.5.6 Membranpräparation**

Zur Präparation der Membranfraktion wurden die behandelten und nicht-behandelten Zellen mit dem Zellschaber gesammelt, mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 3 mM Phosphat-gepufferter Saccharose-Lösung aufgenommen und anschließend mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Nach Zentrifugation ( $2000 \times g$ , 4 min bei 4 °C) wurden die Überstände gepoolt und bei  $11.000 \times g$  bei 4 °C für 25 min zentrifugiert. Danach wurden die aufgenommenen Überstände erneut bei  $20.000 \times g$  und 4 °C für 45 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS aufgenommen und bis zur Western Blot Analyse in flüssigem Stickstoff gelagert.



### 3.5.7 Western Blot

Die Zellen wurden in der Erholungsphase mit dem Zellschaber gesammelt und durch 4 Frier-Tau-Zyklen lysiert. Dann wurde der Proteingehalt mit der Bradford-Methode bestimmt [28]. 40 µg pro Probe wurden auf 12,5 % SDS-Gel separiert und auf Nitrozellulose transferiert. Die Membranen wurden mit 10 % FKS und 10 % bovinem Serumalbumin in TBS (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 8,0) für 3 Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Die Blots wurden dann einmal in TBS mit 0,5 % Tween-20 und dreimal mit TBS gewaschen und für eine Stunde mit einem anti-HSP72-AK (C92F3A-5, StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, BC, Kanada) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit einem Alkalische-Phosphatase-konjugierten Sekundär-AK. Die Blots wurden gewaschen und in 0.45 mM 5-Brom-4-chlor-3-Indolylphosphat (BCIP, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 0.27 mM Nitroblautetrazolium (NBT, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), in AP-Puffer (100 mM TRIS, 100 mM NaCl, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5) inkubiert, bis sich die Banden entwickelten.

### 3.5.8 Isolation von NK-Zellen

Die Isolation von NK-Zellen erfolgte durch negative Selektion anhand der von Voshol et al. beschriebenen Methode [203]. Aus je 60 bis 80 ml Blut von gesunden Probanden wurden periphere Blutlymphozyten (PBL) per Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Histo-Paque, Dichte 1,077, Zentrifugation bei 400 x g für 30 min) aus der Interphase gewonnen. Dann wurden die Zellen dreimal in RPMI-Medium (angereichert mit 25 mM HEPES, 5 % hitzeinaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamine, Penicillin/Streptomycin) gewaschen. Nach Resuspension wurden 1 bis  $1,5 \times 10^7$  Zellen pro ml Medium aufgenommen. Zur Elimination der Monozyten wurde deren Eigenschaft zur Adhärenz an Plastikmaterial genutzt. Die Zellen wurden für eine Stunde in Plastik-Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) in einem Inkubationsschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und danach wurden die nicht-adhären Zellen gesammelt. Der nächste Schritt galt der Reduzierung von B-Lymphozyten auf der Basis ihrer Bindung an Nylon-Wolle. Nylon-Wolle (Typ 200L, Du Pont de Nemours, Wilmington, DE, USA) wurde in PBS gewaschen. Dann wurden Filtrationssäulen vorbereitet (0,6 g getrocknete Nylonwolle in einer 10 ml Spritze) und autoklaviert. Vor der Filtration wurden die Säulen mit RPMI-Medium gewaschen und für 1 Stunde präinkubiert. Dann wurden 25 bis  $30 \times 10^7$  Zellen in 1 bis 2 ml Medium auf die Säule aufgebracht und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die nicht-adhären Zellen wurden dann mit 25 ml vorgewärmten Medium ausgewaschen und für den nächsten Schritt vorbereitet. Die T-Lymphozyten wurden per anti-CD3-Panning eliminiert. Dazu wurden  $3 \times 10^7$  Zellen in 30 µl einer anti-CD3-Antikörper-Lösung (anti-Leu-4, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)

aufgenommen und 45 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach in PBS mit 5 % FKS gewaschen und in einer Konzentration von  $10^7$  Zellen per ml PBS/FKS aufgenommen. Für das Panning wurden sterile Petrischalen (10 cm Ø) mit 10 ml einer Lösung aus einem Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper (5 µg/ml, M2650, Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland) in PBS über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Petrischalen wurden nach dem Coating dreimal mit PBS/FKS gewaschen. Für das Panning wurden 3 ml der Zellsuspension per Petrischale aufgetragen und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schalen vorsichtig geschüttelt und für weitere 45 min inkubiert. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden in Medium aufgenommen und die Petrischalen zweimal mit Medium gewaschen. Die Zellen wurden dann in RPMI-Medium aufgenommen und dreimal gewaschen. Die selektionierten Zellen wurden als aufgereinigte NK-Effektorzellfraktion für weitere Experimente genutzt. Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit IL-2 (100 IU/ml) für 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die phänotypische Verifikation der NK-Zellen (CD3-, CD16+ und CD56+) erfolgte durchflusszytometrisch unter Anwendung der Simultest-Lösung von Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA), die die monoklonalen Antikörper anti-Leu-4 (anti-CD3, Fluorescein-markiert) und anti-Leu11c (anti-CD16) und anti-Leu-19 (anti-CD56, beide PE-markiert) enthält. Nach Färbung der NK-Zellfraktion mit der Simultest-Lösung erfolgte die Zweifarb-Durchflusszytometrie an einem FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

### **3.5.9 In vitro zellvermittelte Lyseexperimente**

Die in vitro zellvermittelten Lyseexperimente erfolgten unter Anwendung des dafür standardisierten Zytotoxizitäts-Testkits Tox-7 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland). Dieses Testkit basiert auf der lysebedingten LDH-Freisetzung der Zielzellen und weist mit dem <sup>51</sup>Crom-Release-Assay vergleichbare Resultate auf. Die Durchführung der in vitro Lyseexperimente erfolgte in ausgewählten Effektor-zu-Zielzell-Verhältnissen (1: 5, 1: 10, 1: 20 und 1: 40). Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vorsichtig von der Kulturflaschenboden gelöst und dreimal in Medium gewaschen. Für Blockungsexperimente wurden die Zielzellen mit einem anti-HSP72-Antikörper (C92F3A-5, Stressgen Corp., Victoria, BC, Kanada) präinkubiert. Je 5000 unbehandelte und hyperthermiebehandelte Zellen (ACHN oder PC-3 Zellen) in 100 µl Medium wurden in 96-Loch-Platten (Rundboden) aufgetragen. Je nach Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis wurden IL-2 stimulierte NK-Zellen in einem Volumen von 100 µl Medium

dazugegebenen. Die Zellen wurden zentrifugiert und für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Dann wurden die LDH-Lösung laut Herstelleranweisung dazugegeben, die Proben wurden für 20 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert die Fluoreszenz bei 490 nm gemessen. Die spezifische Lyse wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = \frac{\text{experimentelle LDH-Freisetzung} - \text{spontane LDH-Freisetzung}}{\text{maximale LDH-Freisetzung} - \text{spontane LDH-Freisetzung}} \times 100 \%$$

Die spontane LDH-Freisetzung wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{spontane LDH-Freisetzung [\%]} = \frac{\text{spontane LDH-Freisetzung}}{\text{maximale LDH-Freisetzung}} \times 100 \%$$

### **3.6. zytoplasmatische HSP72-Expression**

#### **3.6.1 Karzinom- und Normalgewebe**

Für die Untersuchungen wurden in Paraffin eingebettete Gewebeproben von 53 Nephrektomiepräparaten mit Nierenzellkarzinomen und 10 histologisch gesicherten Metastasen von 6 dieser Patienten aus der Tumorbank des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Charité verwendet. Von 21 Patienten wurde neben der Untersuchung des Karzinomgewebes auch das normale Nierenparenchymgewebe analysiert.

Die operative Behandlung der Patienten erfolgte in 52 Fällen an der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Charité und in einem Fall an der Urologischen Abteilung des St.-Hedwigs-Krankenhauses Berlin im Zeitraum 1992 bis 1999.

Das Staging der Nierenzellkarzinome erfolgte auf der Basis der TNM-Klassifikation von 1997 [66]. Die Befunde vor 1997 wurden demzufolge nachklassifiziert.

Die Beurteilung des Tumorgradings wurde anhand der an der WHO angelehnten Mainzer Klassifikation durchgeführt [189]. Es wurde der Gesamttumor analysiert und der jeweils höchste Grad, unabhängig seiner quantitativen Ausbreitung angegeben.

Die histopathologische Subtypisierung der Nierenzellkarzinome erfolgte auf der Grundlage der UICC Klassifikation von 1997 [185]. Dabei wurden der häufig auftretende hellzellige Subtyp, sowie die papillären, chromophoben, und nicht-klassifizierbaren Nierenkarzinomtypen unterschieden. Ductus-Bellini-Karzinome (Sammelrohrkarzinome) wurden nicht in die immunhistochemische Analyse einbezogen.

### 3.6.2 Patientengut

Es wurden insgesamt die Präparate von 53 Patienten mit Nierenzellkarzinomen untersucht. Das mediane Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose betrug 57 Jahre (34 bis 72 Jahre). Das Patientenkollektiv bestand aus 14 weiblichen und 39 männlichen Patienten. Die histopathologischen Befunde ergaben pT1-Karzinome in 8 Fällen (15,1 %), pT2-Karzinome in 7 Fällen (13,2 %) und pT3-Karzinome in 38 Fällen (71,7 %). Ein pT4 NZK wurde nicht diagnostiziert. Zum Zeitpunkt der Operation lag bei 7 Patienten ein Lymphknotenbefall vor, der in 2 Fällen als pN1 und in 5 Fällen als pN2 klassifiziert wurde.

Bei 21 Patienten (39,6 %) bestand synchron mit dem Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits eine metastasierte Erkrankung. Bei 12 Patienten lag eine pulmonale Metastasierung vor, je ein weiterer Patient wies eine mediastinale, hepatische, adrenale und ossäre Metastasierung und eine Patientin retroperitoneale Lymphknotenmetastasen auf. Ein weiterer Patient hatte eine Metastasierung in den Lungen und in der Leber und 3 Patienten wiesen Metastasen in drei und mehr Organsystemen auf.

Das Grading lautete G1 bei 3 Patienten (5,7 %), G2 bei 34 Patienten (64,1 %) und G3 bei 16 Patienten (30,2 %).

Bei den histologischen Subtypisierungen wurde lediglich zwischen hellzelligen und nicht-hellzelligen NZK unterschieden. Bei 43 Patienten (81,1 %) wurde ein hellzelliges NZK diagnostiziert und 10 Patienten (18,9 %) wiesen ein nicht-hellzelliges NZK auf.

Bei 52 von 53 konnten Daten zum weiteren klinischen Verlauf erfasst werden. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 33 Monate (2 bis 108 Monate). Im Verlauf entwickelten weitere 15 Patienten Fernmetastasen nach einem medianen Zeitraum von 20 Monaten (5 bis 82 Monate). Damit ergab sich für den gesamten Beobachtungszeitraum eine Anzahl von 36 Patienten mit Fernmetastasen. Von 6 Patienten mit Metastasen wurden 10 Metastasen (5 Lungenmetastasen, 3 ossäre Metastasen, eine Metastase in der Restniere und eine Metastase im Omentum majus) immunhistochemisch bezüglich ihrer HSP72-Expression untersucht.

Von den 36 metastasierten Patienten wurden 24 mit einer Chemoimmuntherapie mit der Dreifachkombination von IL-2, IFN- $\alpha$ 2a und 5-FU behandelt. Je nach Ansprechen, erhielten die Patienten ein bis drei Therapiezyklen. Das primäre Therapieergebnis wurde nach dem ersten Zyklus nach den UICC Kriterien beurteilt und mit der HSP72-Expression des Primärtumors korreliert.

### 3.6.3 Immunhistochemische Untersuchungen<sup>5</sup>

Ca. 5 – 7 µm dicke Paraffinschnitte wurden auf speziell oberflächenbehandelte Objektträger aufgebracht (SuperFrost® Plus Microscope Slides, Menzel&Gläser, Braunschweig, Deutschland) und über Nacht bei 45 °C im Brutschrank getrocknet. Danach erfolgte die Entparaffinierung in Xylol für 2 x 10 min sowie anschließend in absolutem Ethylalkohol, 50 %igem Ethylalkohol und Aqua dest. Eine weitere Vorbehandlung der Präparate fand nicht statt.

Die immunhistochemische Färbung begann mit der Inkubation der Präparate mit dem monoklonalen Primärantikörper gegen das 72 kDa HSP (RPN 1197, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland), der in einer Verdünnung von 1 : 150 für 30 min bei Raumtemperatur eingesetzt wurde. Anschließend wurde nicht gebundener Antikörper aus den Präparaten mit Pufferlösung ausgewaschen. In einem weiteren Schritt wurden die Präparate mit einem sekundären Kaninchen-anti-Maus-IgG-Brückenantikörper (DAKOCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) und dem APAAP-Komplex (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase, DAKOCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) über 30 min bei Raumtemperatur behandelt. Dazwischen wurden die Präparate mit Puffer gewaschen. Der Vorgang der Färbung mit dem Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex wurde zur Erhöhung der Sensitivität zwei weitere Male für jeweils 15 min wiederholt.

Der Nachweis der APAAP erfolgte mit Chromogen (DAKOCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) für zweimal 15 min bei Raumtemperatur. Um endogene Enzymaktivitäten zu reduzieren, wurde dem Chromogen 0,25 mmol/l Levamisol (DAKOCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) zugesetzt.

Nach erneutem Waschen der Präparate erfolgte eine schwache Gegenfärbung der Zellkerne mit Meyer's Hämalaun (Einwirkzeit 1 min), um die Orientierung am Präparat zu erleichtern. Danach wurden die Präparate noch einmal gewaschen, durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Eukitt eingedeckt. Die Spezifität der Immunfärbung wurde durch das Mitführen von je einer Negativkontrolle pro Schnitt gesichert, bei der anstatt des Primärantikörpers lediglich das hochgereinigte Verdünnungsmedium (DAKOCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) für die Primärantikörper zur Anwendung kam.

---

<sup>5</sup> Die Untersuchungen wurden am Institut für Pathologie, Campus Mitte, Universitätsklinikum Charité durch den Doktoranden Herrn Cand.-Med. S. Richter unter der wissenschaftlichen Anleitung von Herrn Prof. Dr. S. Hauptmann durchgeführt.

### **3.6.4 Semiquantitative Erfassung der HSP72-Expression**

Die immunhistochemische Erfassung der HSP72-Expression erfolgte semiquantitativ mittels lichtmikroskopischer Analyse. Je nach Ausprägung der Rotfärbung wurden 4 Intensitätsstufen unterschieden:

- 0 – keine Anfärbung der Zellen
- 1 – schwache aber eindeutige Rotfärbung der Zellen
- 2 – mäßige Anfärbung der Zellen
- 3 – intensive Rotfärbung der Zellen

Pro Karzinomareal wurden mit dem Lichtmikroskop bei einer 200fachen Vergrößerung 30 Gesichtsfelder ausgewertet. Als Ergebnis wurde jeweils die mittlere Färbeintensität pro Schnitt angegeben. Es wurden nur solche Präparate in die Untersuchung einbezogen, bei denen eine kontrastreiche Immunfärbung mit einer schwachen Hintergrundfärbung vorlag, 3 Präparate wurden nicht berücksichtigt. Nekrosen, Blutungen, narbige Degenerationszonen oder Verkalkungen wurden nicht beurteilt. Die Auswertung erfolgte bei 200facher Vergrößerung (Objektiv 20fach, Okular 10fach) in den jeweils am stärksten angefärbten Karzinomarealen. Positiv- und Negativkontrollen wurden mitgeführt.

### **3.6.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte deskriptiv. Grundlage der Berechnungen waren die mathematischen Mittelwerte der Färbeintensitäten der beurteilten Gesichtsfelder pro individuellem Präparat.

Die Berechnung der Sensitivität, Spezifität und maximalen Effizienz der Methode erfolgte mit einer ROC-Analyse. Der berechnete Cut-Off mit der höchsten Sensitivität und Effizienz wurde für weitere Analysen zugrunde gelegt.

Die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeiten der Patienten erfolgte nach der Kaplan-Meier-Methode. Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen wurden mit dem Log-Rank-Test berechnet. Das Überleben der Patienten wurde ab Zeitpunkt der Erstdiagnosestellung berechnet. Bei den Patienten, die mit einer Chemoimmuntherapie behandelt worden waren, erfolgte die Ermittlung der Überlebenszeit ab Beginn der Therapie.

In univariaten Analysen wurde der Einfluss bestimmter Prognoseparameter auf das Überleben der Patienten ermittelt. Die Daten der univariaten Analyse wurden in einer multivariaten Analyse weiter verarbeitet, um unabhängige Prognoseparameter zu ermitteln. Zur Anwendung kamen die Statistikprogramme GraphPad 3.0L, GrahRoc (PRISM, San Diego, CA, USA) und SPSS (Scientific Package for Social Science, Version 11.0 for Windows, SPSS, Chicago, IL, USA).

### **3.7 HSP70-Peptid-Komplexe**

#### **3.7.1 Zelllinien und Kulturbedingungen**

In den Untersuchungen kamen die murine Melanomlinie B16-F1 (ATCC CRL-6323), die humane Nierenkarzinomlinie ACHN (ATCC CRL-1611) und primärkultivierte Nierenkarzinomzellen zur Anwendung. Die Kultivierung der ACHN-Zellen erfolgte nach den im Abschnitt 3.5.1, Seite 33 und die Gewinnung und Kultivierung der Primärkulturen nach den im Abschnitt 3.5.2, Seite 33 der beschriebenen Bedingungen. Die murinen B16-F1-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium unter Zugabe von 10 % FKS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), Natriumpyruvat (1 mM), L-Glutamin (4 mM) und kultiviert. Die Kultur der Zellen erfolgte in einem Zellinkubator bei 37 ° C mit 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **3.7.2 Anreicherung von HSP70-Peptid-Komplexen**

Die Aufreinigung von HSP70-Peptid-Komplexen erfolgte auf der Basis der hohen Affinität von HSP70-ADP-Komplexen zu Peptiden durch ADP-Affinitätschromatographie. Dazu wurde das Tumorzellpellet in hypotonem Puffer (10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 mM PMSF, pH 7,1) aufgenommen, inkubiert und homogenisiert. Das Lysat wurde anschließend bei 100,000 x g für 60 min zentrifugiert und der Überstand gewonnen. Es erfolgte der Pufferwechsel (Puffer „S“: 20 mM TRIS-Azetat, 20 mM NaCl, 15 mM β-Mercaptoethanol, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM PMSF, pH 7,5) per Gelfiltration mit einer PD-10 Säule. Anschließend wurde das Lysat auf eine ADP-Agarosesäule (5 ml) aufgetragen, die vorher mit Puffer „S“ äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 2 ml Puffer „S“ unter Zusatz von 0,5 M NaCl und nachfolgend 3 ml Puffer „S“ gewaschen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die HSP70-Peptid-Komplexe wurden nach nochmaliger 30minütiger Inkubation mit 25 ml Puffer „S“ unter Zusatz von 3 mM (ACHN- und primäre NZK-Zellen) oder 60 mM ADP (B16-F1-Zellen) in 1ml Fraktionen eluiert. Es erfolgte ein erneuter Pufferwechsel zu Phosphatpuffer mittels Gelfiltration. Die Bestimmung des Proteingehaltes im Eluat erfolgte mittels der Bradford-Methode [28].

#### **3.7.3 Western Blots**

Die Western-Immunoblots zum Nachweis von HSP70 im ADP-Affinitätschromatographieeluat wurden nach der im Abschnitt 3.5.7, Seite 36 beschriebenen Methode durchgeführt. Als monoklonaler Antikörper kam ein anti-HSP70-AK (N27F3-4, anti-HSP72/73, StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, BC, Kanada) zur Anwendung.

#### **3.7.4 Tierexperimentelle Untersuchungen**

Die präliminäre tierexperimentelle Studie erfolgte nach den Richtlinien des „Animal Care and Use Educational Program“ der University of New Mexico, Health Sciences Center. Es wurde ein prophylaktischer Vakzinationsansatz gewählt. Dazu wurden syngene C57BL/6 (-H2<sup>b</sup>) Mäuse zweimal wöchentlich über 4 Wochen mit aufgereinigten HSP70-Peptid-Komplexen, die aus murinen Melanomzellen der B16-F1-Linie gewonnen wurden, vakziniert. Am Beginn der dritten Behandlungswoche wurden den Tieren jeweils 10<sup>5</sup> B16-F1 Zellen in die linke Flanke injiziert. Die Messung des Tumorwachstums erfolgte bis zum 22. Tag nach Tumorzellinokulation zweidimensional in zweitägigen Abständen.



## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Klinischer Teil**

#### **4.1.1 Chemoimmuntherapie beim metastasierten Nierenzellkarzinom**

##### *Therapieansprechen*

Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 20 Monaten konnten 104 von 107 Patienten hinsichtlich des Therapieansprechens ausgewertet werden. Insgesamt hatten 7 Patienten den ersten Zyklus nicht komplett beendet. Bei 3 Patienten erfolgte keine Therapieauswertung, da sie bereits während der ersten 4 Zykluswochen die Therapie abbrachen. Davon erlitt ein Patient einen akuten Myokardinfarkt mit Todesfolge, der zweite Patient beendete die Therapie wegen zu starker Nebenwirkungen und der dritte Patient zog seine Einverständniserklärung nach zwei Therapiewochen zurück. Bei 4 weiteren Patienten, die die Therapie erst in der zweiten Zyklushälfte nach hochdosierter IL-2-Gabe abbrachen, erfolgte die Auswertung hinsichtlich des Therapieansprechens.

Insgesamt wurde ein objektives Ansprechen bei 23 Patienten (22,1 %, 95 % CI 14,6 – 31,3) mit einem progressionsfreien Intervall von 13 Monaten (5 – 112 Monate) beobachtet. Komplette Remissionen traten bei 8 Patienten (7,7 %) mit einer medianen Dauer von 37,5 Monaten (9 – 112 Monate) auf. Partielle Remissionen wurden bei 15 Patienten (14,4 %) mit einem progressionsfreien Intervall von 8 Monaten (5 – 38 Monate) erzielt.

Bei einer weiteren Gruppe von 48 Patienten (46,2 %) kam es zu einer Stabilisierung der Erkrankung mit einem progressionsfreien Intervall von 8 Monaten (4 – 46 Monate). Nur 33 Patienten (31,7 %) blieben auch unter Therapie progredient. Diese Patienten erhielten keinen zweiten Zyklus Chemoimmuntherapie. Die Gesamtansprechraten sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8)      Ansprechverhalten nach Chemoimmuntherapie

auswertbare Patienten (n = 104)				
	Remissionsrate		progressionsfreies Intervall (Monate)	
CR	8	7,7 %	37.5	(9 – 112)
PR	15	14,4 %	8	(5 – 38)
CR + PR	23	22,1 %	13	(5 – 112)
SD	48	46,2 %	8	(4 – 46)
PD	33	31,7 %	-	

(CR = komplette Remission, PR = partielle Remission, SD = Stabilisierung, PD = Progression)

Die Remissionen traten am häufigsten bei Lungenmetastasen auf (20 Patienten), gefolgt von Lymphknotenmetastasen (8 Patienten), lokalen Rezidiven, Skelettmetastasen und Lebermetastasen (jeweils 3 Patienten).

### *Überleben*

Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 20 Monaten waren noch 35 der 104 Patienten am Leben. 7 dieser Patienten hatten weiterhin keinen Anhalt auf Metastasen (NED, no evidence of disease). Bei 28 weiteren Patienten bestanden Metastasen (alive with tumor). Das mediane Überleben aller Patienten lag bei 19 Monaten. Die Ein-, Zwei- und 5-Jahresüberlebensrate lag bei 70, 40 und 17 % (siehe Abbildung 1).

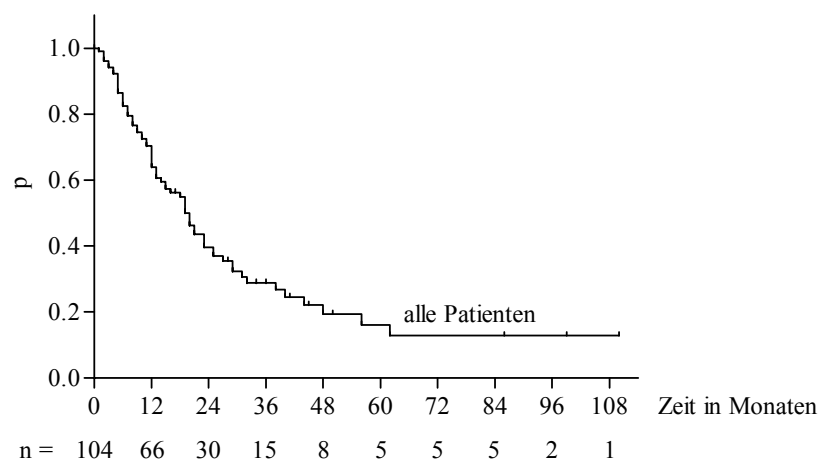


Abb. 1) Überlebenswahrscheinlichkeit für 104 Patienten

Es bestand eine signifikante Beziehung zwischen dem Therapieansprechen und dem Überleben. Patienten mit einer CR (n=8), einer PR (n=15) und Patienten mit einer Stabilisierung (n=48) hatten ein medianes Überleben von 83, 31 bzw. 23 Monaten. Im Vergleich dazu lag das mediane Überleben bei Patienten ohne Ansprechen (PD, n=33) bei nur 7 Monaten ( $p < 0,0001$ , Log-Rank-Test, siehe Abbildung 2).

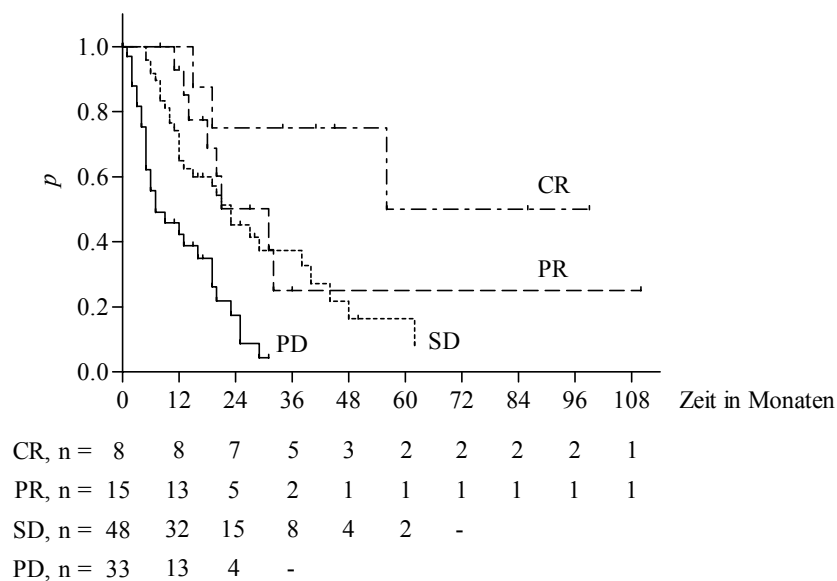


Abb. 2) Überlebensanalyse in Abhängigkeit vom Ansprechverhalten

### *Toxizität/Nebenwirkungen*

Die Chemoimmuntherapie wurde insgesamt gut toleriert. Die Nebenwirkungen wie Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit, Hypotonie, Gewichtsverlust und Hautirritationen traten überwiegend als WHO Grad I und II Toxizitäten auf. 7 Patienten konnten den ersten Zyklus nicht vollständig beenden. Ein Patient mit einem sarkomatoiden NZK war bereits während des ersten Zyklus im massiven Progress. Bei den 6 anderen Patienten führte das Auftreten schwerer Nebenwirkungen zum Abbruch der Therapie. Drei Patienten verstarben unter Therapie. Ein Patient verstarb infolge eines akuten Myokardinfarktes, der zweite Patient erlitt eine akute Lungenembolie auf der Basis einer nicht bekannten tiefen Beinvenenthrombose und der dritte Patient war unter Therapie progredient und verstarb direkt nach dem ersten Zyklus unter dem Bild eines septischen Schocks mit Multiorganversagen.

Die Therapie musste bei 21 Patienten (20 %) temporär wegen WHO Grad III Toxizitäten unterbrochen werden, zeitweilige Dosisreduktionen waren bei weiteren 20 Patienten (19 %) notwendig.

Insgesamt wurden alle Patienten im Durchschnitt mit 2,0 Therapiezyklen behandelt. Bei 43 Patienten, die mit einer Remission oder zumindest einer Stabilisierung auf die Therapie ansprachen, wurde das Therapieprotokoll mit der Gesamtzahl von 3 Zyklen vollständig angewandt.

### *Einfluss von 13-CRA auf das Therapieergebnis*

Die zusätzliche Einfluss von 13-CRA auf den Behandlungseffekt der Chemoimmuntherapie wurde bei insgesamt 72 Patienten mit einem Karnofsky-Performance-Index (KPI) von mindestens 80 % retrospektiv analysiert. 36 Patienten erhielten die Dreifachkombination von IL-2, IFN- $\alpha$ 2a und 5-FU. Die anderen 36 Patienten erhielten eine Vierfachkombination unter Zugabe von 13-CRA (3 x 20 mg) täglich über einen gesamten Therapiezyklus. Beide Gruppen waren hinsichtlich wesentlicher Patientenmerkmale vergleichbar. Die wichtigsten Patientencharakteristika sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab. 9) Patientencharakteristika beider Therapiegruppen

Patientencharakteristika	Dreifachtherapie	Vierfachtherapie
Anzahl der Patienten	36	36
medianes Follow-up	16 Monate	17 Monate
medianes Alter	57 Jahre (35 – 71)	56 Jahre (35 – 72)
weiblich : männlich	10 : 26	5 : 31
synchron : metachron	17 : 19	12 : 24
Tumornephrektomie	alle Patienten	alle Patienten
Lymphknotenbefall	7 (19 %)	7 (19 %)
Grading $\geq$ G 3	10 (28 %)	10 (28 %)
KPI $\geq$ 80 %	alle Patienten	alle Patienten
metastasierte Organsysteme		
eins	14 (38 %)	15 (42 %)
zwei	11 (31 %)	8 (22 %)
drei oder mehr	11 (31 %)	13 (36 %)
Lokalisation der Metastasen		
Lungen	28 (78 %)	28 (78 %)
Skelett	7 (19 %)	8 (22 %)
Leber	7 (19 %)	4 (11 %)
Nebenniere	4 (11 %)	3 (8 %)
Lymphknoten	11 (31 %)	19 (53 %)
lokale Rezidive	2 (14 %)	2 (6 %)
andere	9 (25 %)	17 (47 %)

35 Patienten mit der Dreifachtherapie konnten und 34 Patienten mit der Vierfachkombination konnten hinsichtlich des Therapieansprechens ausgewertet werden. Bei einem Patienten wurde

die Therapie wegen eines akuten Myokardinfarktes und bei den beiden anderen Patienten wegen hoher, persistierender Nebenwirkungen abgebrochen. Damit konnte bei insgesamt 69 Patienten eine Auswertung vorgenommen werden.

Zwischen den Patientengruppen gab es hinsichtlich des Therapieansprechens keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,4800$ , Fisher's Exakt-Test). Objektive Remissionen traten in 34,3 % (95 % CI 19,1-52,2) in der Gruppe der Dreifachtherapie und in 26,4 % (95 % CI 12,9-44,4) in der Gruppe der Vierfachtherapie auf. Das Ansprechverhalten beider Gruppen ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tab. 10) Ansprechverhalten nach Chemoimmuntherapie (Dreifachtherapie) und unter Zugabe von 13-CRA (Vierfachtherapie)

	Dreifachtherapie, n = 35				Vierfachtherapie, n = 34			
	Remissionsrate		progressionsfreies Intervall (Monate)		Remissionsrate		progressionsfreies Intervall (Monate)	
CR	4	(11,4 %)	63,5	(13 – 112)	3	(8,8 %)	13	(9 – 45)
PR	8	(22,9 %)	9,5	(5 – 38)	6	(17,6 %)	7,5	(5 – 17)
SD	15	(42,9 %)	8	(5 – 46)	17	(50 %)	10	(4 – 22)
PD	8	(22,8 %)			8	(23,6 %)		

Die Überlebensanalyse nach der Kaplan Meier Methode ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen ( $p=0,9353$ , Log-Rank-Test). Das mediane Überleben betrug in beiden Gruppen 21 Monate. Die Ein- und Drei-Jahres-Überlebensraten lagen in der Dreifachtherapiegruppe bei 76 % und 32 % gegenüber 82 % und 37 % für die Patientengruppe der Vierfachkombination (siehe Abb. 3).

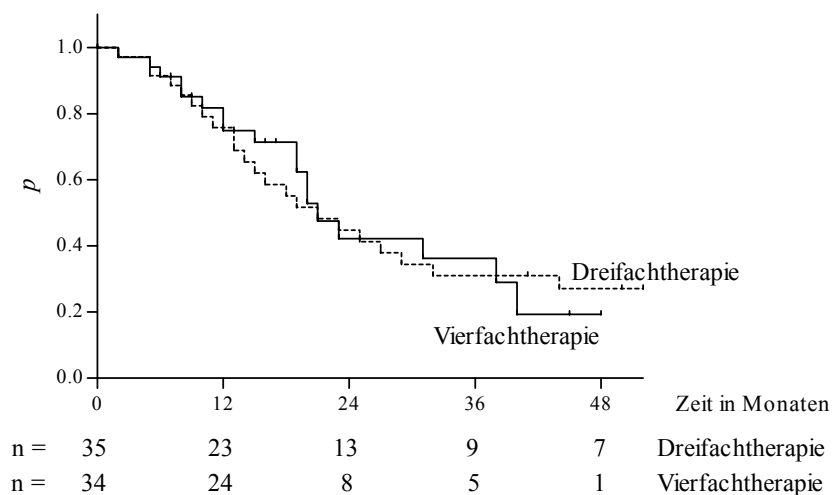


Abb. 3) Überlebenswahrscheinlichkeiten beider Therapiegruppen

#### *Uni- und multivariate Analysen*

Der Einfluss verschiedener Faktoren auf das Überleben der Patienten wurde anhand von uni- und multivariaten Analysen geprüft. Es wurden folgende Faktoren untersucht: Alter der Patienten, Geschlecht der Patienten, KPI vor Therapiebeginn ( $< 80\%$  versus  $\geq 80\%$ ), T-Kategorie des Primärtumors (pT1/2 versus pT3/4), N-Status bei Operation (pN0 versus pN1/2), Grading des Primärtumors (G1/2 versus G3/4, Präsenz von Lungen- bzw. Skelettmetastasen, Zeitpunkt zwischen Auftreten der Metastasen ( $< 2$  Jahre versus  $> 2$  Jahre) sowie die Anzahl der befallenen Organsysteme (ein Organsystem versus 2 oder mehr Organsysteme).

Der KPI hatte einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten. Abbildung 4 demonstriert die Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit einem KPI von  $\geq 80\%$  ( $n=83$ ) gegenüber Patienten mit einem KPI von  $< 80\%$  ( $n=21$ ). Das mediane Überleben lag bei Patienten mit einem hohen KPI mit 23 Monaten deutlich über dem von Patienten mit einem KPI von  $< 80\%$  mit nur 7 Monaten ( $p=0,0001$ , Log-Rank-Test).

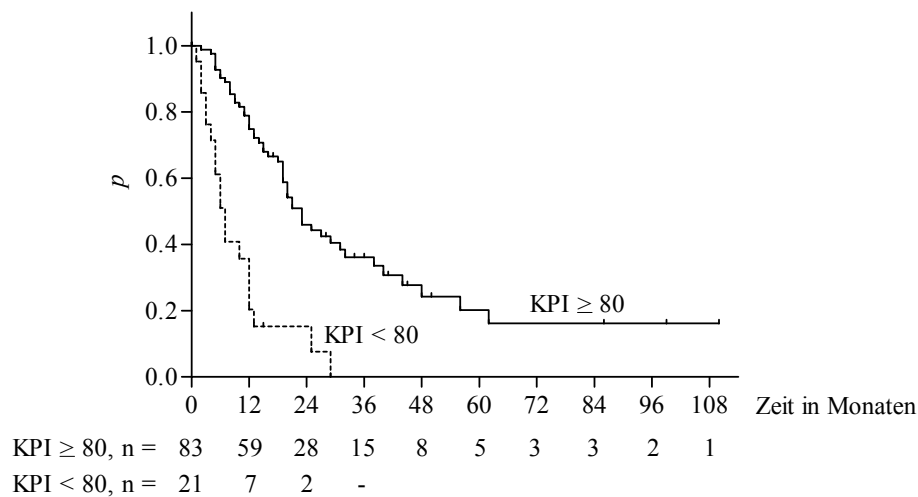


Abb. 4) Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit einem KPI  $\geq$  bzw.  $<$  80 %.

Neben dem KPI ergab sich auch für das histologische Grading des Primärtumors eine signifikante Beziehung zum Überleben der Patienten. Die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Grading ist in Abbildung 5 dargestellt. Bei Patienten mit einem primären Grading G1/2 (n=64) betrug die mediane Überlebenszeit 25 Monate im Gegensatz zu den Patienten mit G3/4 Karzinomen (n=32) mit 14 Monaten (p=0,0231, Log-Rank-Test). Bei 8 Patienten lag keine Information zum primären Grading vor.

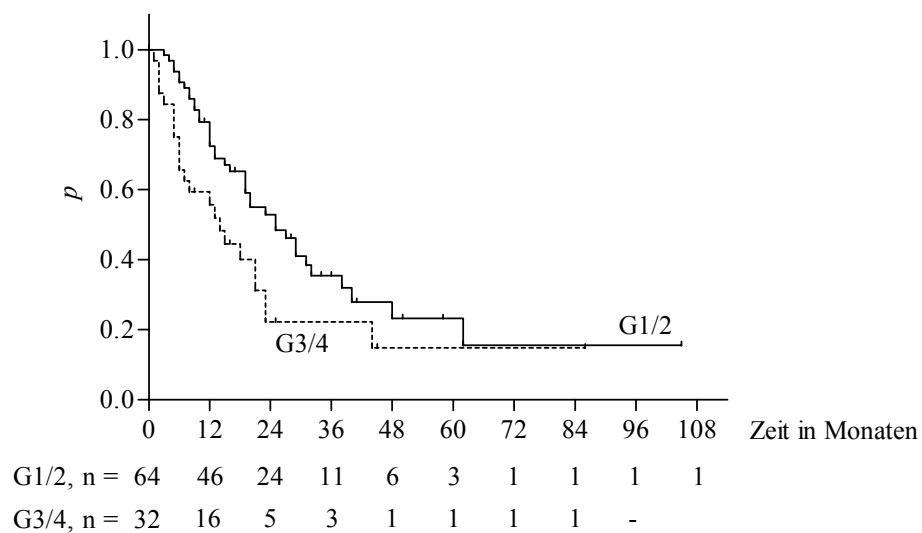


Abb. 5) Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Grading des Primärtumors

Die Ergebnisse der multivariaten Analyse sind in Tabelle 11 aufgeführt. Lediglich der KPI und der Zeitraum bis zur Diagnose der Fernmetastasen erwiesen sich als signifikante Faktoren, die mit einer ungünstigen Prognose assoziiert waren. Die Anzahl der befallenen Organsysteme war ein marginal signifikanter prognostischer Faktor.

Tab. 11) Ergebnisse der multivariaten Analyse (\* = signifikant).

Faktor	p-Wert	relatives Risiko	95 % CI
Karnofsky-Performance-Index < 80 %	< 0,0001*	6,351	3,251 – 12,381
Zeitraum bis zur Metastasierung $\leq$ 2 Jahre	0,009*	2,425	1,244 – 4,729
Anzahl der befallenen Organsysteme > 1	0,087	1,642	0,931 – 2,896

#### **4.1.2 Chemoimmuntherapie und synchrone Bestrahlung**

Bei insgesamt 20 Patienten wurde die Chemoimmuntherapie mit IL-2, IFN- $\alpha$ 2a, 5-FU und 13-CRA mit einer perkutanen Bestrahlung von Skelettmetastasen oder Lymphknotenmetastasen bzw. lokalen Rezidiven synchron kombiniert. Diese Kombinationstherapie erfolgte bei 11 Patienten als „first-line“-Therapieansatz und bei 9 Patienten als „second-line“-Ansatz nach vorangegangener Chemoimmuntherapie und erneuter Progression bei diesen Patienten.

##### *Ergebnisse bei den „first-line“ Patienten*

Das mediane Alter der 11 Patienten (3 Frauen und 8 Männer) betrug 61 Jahre (35 – 69 Jahre). 6 Patienten hatten eine synchrone und 5 Patienten eine metachrone Metastasierung, die nach einem medianen Intervall von 23 Monaten (2 – 48 Monate) diagnostiziert wurde. Die Patienten wurden im Durchschnitt mit 2 Therapiezyklen behandelt. Bei 5 Patienten wurden Skelettmetastasen bestrahlt, bei 5 weiteren Patienten wurden Lymphknotenmetastasen und einem Patient ein lokales Rezidiv mit einer Gesamtdosis zwischen 30 bis 40 Gy bestrahlt. 8 Patienten wiesen zusätzlich Symptome wie Schmerzen bzw. einen Subileus auf. Es wurde eine objektive Remissionsrate von 27,3 % (95 % CI 6,0-61,0) erzielt. Dabei traten 2 CR (18 %) und 1 PR (9 %) und zusätzlich 5 Stabilisierungen (SD, 46 %) auf. Patienten mit einer CR oder PR zeigten ein längeres progressionsfreies Intervall als Patienten mit einer SD (27 Monate versus 6 Monate). Nur 3 Patienten blieben unter der Therapie progredient. Es gab eine gute Korrelation zwischen dem Ansprechen an der Bestrahlungslokalisation und dem allgemeinen Ansprechen. Bei 7 von 8



Patienten wurde ein deutlicher Rückgang der Symptome beobachtet, die sich in einer Reduzierung der Schmerzmedikation äußerte.

#### *Ergebnisse bei den „second-line“ Patienten*

9 Patienten (2 Frauen und 7 Männer) wurden mit der Kombinationstherapie als „second-line“ Ansatz behandelt. Bei 7 Patienten trat die Metastasierung metachron nach einem Intervall von 21 Monaten (3 – 54 Monate) auf. Alle Patienten waren progredient nach vorangegangener Chemoimmuntherapie und einem Intervall von 15 Monaten (2 – 45 Monate). Das mediane Alter der Patienten war 55 Jahre (48 – 72 Jahre). Die Patienten erhielten im Durchschnitt 1,3 Zyklen Chemoimmuntherapie. Bei 4 Patienten wurden Skelettmetastasen bestrahlt, bei 3 weiteren Patienten lokale Rezidive und bei 2 Patienten Lymphknotenmetastasen. 7 der 9 Patienten hatten Symptome wie Schmerzen, Dyspnoe und neurologische Symptome. Bei diesen multipel vorbehandelten Patienten wurde keine objektive Remission beobachtet. Es konnte jedoch bei 5 Patienten (56 %) eine Stabilisierung mit einer medianen Dauer des progressionsfreien Intervalls von 8 Monaten (3 – 22 Monate) erzielt werden.

#### *Überleben*

Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 11,5 Monaten (4 – 32 Monate) waren 6 der 20 Patienten (20 %) noch am Leben. Ein Patient war weiterhin in einer CR und die anderen Patienten hatten Metastasen. Das mediane Überleben aller Patienten betrug 11 Monate. Die Ein- und Zwei-Jahres-Überlebensrate betrug 50 % und 35 %.

Das mediane Überleben bei den „first-line“-Patienten lag bei 12 Monaten. Patienten, die auf die Therapie mit einer CR, PR oder SD reagierten (n=8) hatten mit 15 Monaten ein signifikant verlängertes Überleben als Patienten ohne Ansprechen (n=3) mit 7 Monaten (p=0,0049, Log-Rank-Test, siehe Abbildung 6). Die Ein- und Zwei-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit aller Patienten lag bei 55 % und 27 %.

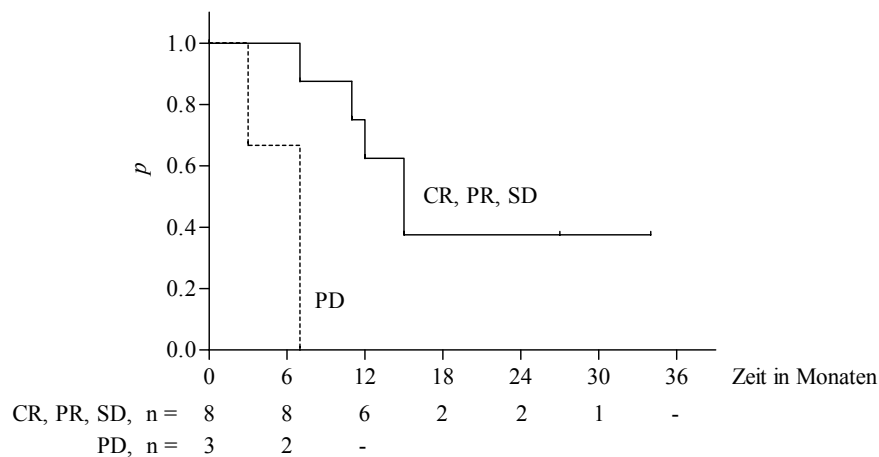


Abb. 6) Überlebenswahrscheinlichkeit bei den „first-line“ Patienten.

Bei den „second-line“-Patienten betrug das mediane Überleben 11 Monate. Bei den Patienten mit einer Stabilisierung (n=5) war der Median nach 36 Monaten der Nachbeobachtung noch nicht erreicht. Bei den progredienten Patienten (n=4) betrug das mediane Überleben 6 Monate. Dieser Unterschied war nicht signifikant ( $p=0,1012$ , Log-Rank-Test, siehe Abbildung 7). Die Ein- und Zwei-Jahres-Überlebensrate betrug jeweils 44 %.

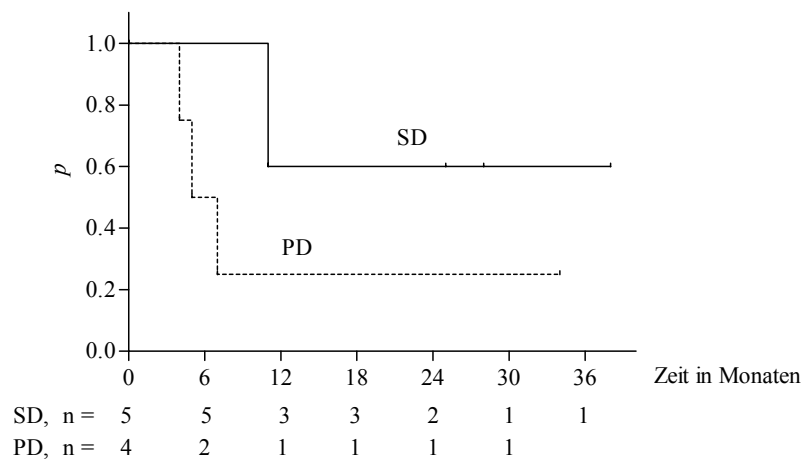


Abb. 7) Überlebenswahrscheinlichkeit bei den „second-line“ Patienten.

### Toxizität/Nebenwirkungen

Die Nebenwirkungen der Therapie waren im Vergleich zur alleinigen Chemoimmuntherapie kaum erhöht. Symptome wie Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit, Hypotonie, Gewichtsverlust und

Hautirritationen traten überwiegend als WHO Grad I und II Toxizitäten auf. Bei 2 Patienten musste die Therapie nach dem ersten Zyklus abgebrochen werden. Ein Patient entwickelte eine Autoimmun-Thrombozytopenie und der zweite Patient litt unter therapieresistenter Übelkeit. Bestrahlungs-assoziierte Nebenwirkungen im Sinne einer moderaten aktinischen Ösophagitis traten bei zwei Patienten auf, bei denen mediastinale Lymphknoten bestrahlt wurden.

#### **4.1.3 Therapie von Patienten mit venösen Tumorthromben der Stadien III und IV (nach Staehler)**

##### *Peri- und postoperative Ergebnisse*

Im Zeitraum von Juli 1992 bis November 2000 wurden an unserer Klinik 24 Patienten mit einem NZK und Extension eines Tumorthrombus in die Vena cava inferior im Stadium III und IV nach Staehler operiert. Von diesen Patienten wiesen 13 Patienten ein pT3b, 10 Patienten ein pT3c und ein Patient ein pT4 Nierenzellkarzinom auf. Ein Lymphknotenbefall wurde bei 3 Patienten diagnostiziert (2 Patienten pN1, ein Patient pN2). Bei 20 Patienten wurden zum Zeitpunkt der Operation keine Fernmetastasen festgestellt, bei 4 Patienten waren zu diesem Zeitpunkt Fernmetastasen bekannt. Die histologischen Befunde der Primärtumoren ergaben 20 hellzellige, 2 papilläre und 2 chromophobe NZK. In 18 Fällen wurde ein G2 Karzinom und in 6 Fällen ein G3 Karzinom festgestellt.

Die peri- und postoperative Mortalität der Patienten mit Vena-cava-Zapfen im Stadium III und IV betrug 4 %. Die Mortalität für die 13 Patienten im Stadium III betrug null Prozent. Von den 11 im Stadium IV operierten Patienten verstarb eine adipöse Patientin (9 % im Stadium IV) am 21. postoperativen Tag an einer Sepsis mit Multiorganversagen infolge einer Duodenalperforation, Pankreatitis und Pneumonie.

In Tabelle 12 sind peri- und postoperative Komplikationen aufgeführt. Als postoperative Phase wurden die ersten 30 Tage definiert. Insgesamt traten bei 12 Patienten (50 %) schwere Komplikationen auf. Für Patienten im Stadium III betrug die Komplikationsrate 31 % und für Patienten im Stadium IV 73 %.

Tab. 12)      Komplikationen (n=24)

Patient / Geschlecht / Alter	Stadium	Komplikationen
C. K. / w / 59 Jahre	III	Pleuraerguss, NNR-Insuffizienz
H. B. / m / 56 Jahre	III	tiefe Beinvenenthrombose
E. M. / m / 55 Jahre	III	akutes Nierenversagen
H. M. / m / 68 Jahre	III	Pleuraerguss, Pneumonie
R. B. / w / 67 Jahre	IV	Durchgangssyndrom, NNR-Insuffizienz
W. M. / m / 49 Jahre	IV	Querschnittssyndrom, Durchgangssyndrom
R. T. / w / 62 Jahre	IV	Durchgangssyndrom, TIA
W. G. / m / 69 Jahre	IV	akutes Nierenversagen
H. G. / m / 57 Jahre	IV	Durchgangssyndrom, perihepatisches Hämatom
A. S. / w / 73 Jahre	IV	Duodenalperforation, Pneumonie, Exitus letalis
P. K. / m / 53 Jahre	IV	systemische Candida-Infektion
W. A. / m / 70 Jahre	IV	tiefe Beinvenenthrombose

In Tabelle 13 sind perioperative Kriterien wie stationäre Aufenthaltsdauer, Dauer des Aufenthaltes auf der Intensivstation, Operationsdauer, die Dauer des kardiopulmonalen Arrests und die Anzahl der intraoperativ transfundierten Erythrozytenkonzentrate aufgeführt.

Tab. 13)      Peri- und postoperative Ergebnisse aller Patienten (n=24).

	Median	Min. – Max.
prä- und postop. stationäre Aufenthaltsdauer (Tage)	29	14 – 54
Intensivstation (Tage)	4	1 – 19
OP-Dauer (Stunden:Minuten)	6:18	3:05 – 11:50
kardiopulmonaler Arrest (Minuten, n=11)	20	9 – 35
intraop. transfundierte Ery-Konzentrate (Anzahl)	11,5	4 – 84

### *Progression und Überleben der Patienten*

Das kalkulierte Überleben aller Patienten (n=24) ab Operation ist in Abbildung 8 dargestellt. Das mediane Überleben betrug 45 Monate und unterschied sich damit nicht signifikant von den Patienten der Kontrollgruppe ohne Vena-cava-Zapfen mit 50 Monaten. Das mediane progressionsfreie Intervall in der Zapfen-Gruppe lag bei 10 Monaten und war damit signifikant kürzer als in der Kontrollgruppe mit 15 Monaten ( $p=0,0302$ , Log-Rank-Test, Daten nicht

gezeigt). Die Ein-, Drei- und Fünf-Jahres-Überlebensraten der gesamten Gruppe betrugen 92 %, 57 % und 33 %.

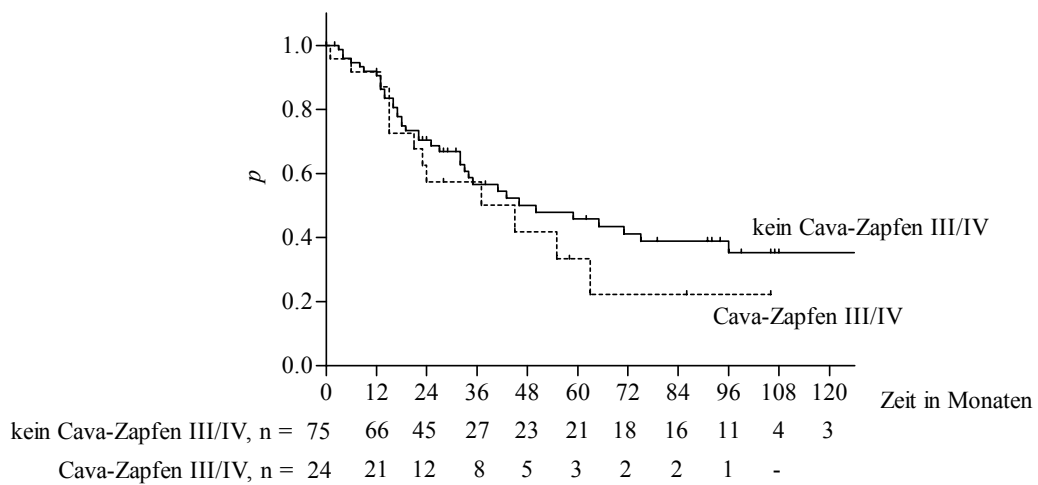


Abb. 8) Überlebensanalyse der 24 Patienten mit venösen Tumorthromben im Vergleich zu den 75 Patienten der Kontrollgruppe. Das mediane Überleben unterschied sich nicht signifikant (50 Monate ohne Zapfen vs. 45 Monate mit Zapfen,  $p=0,3522$ , Log-Rank-Test).

Von den 20 Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation keine metastasierte Erkrankung aufwiesen, entwickelten 14 in der weiteren Nachbeobachtung Fernmetastasen. Damit waren 18 von 24 Patienten im metastasierten Stadium (75 %). Von den 18 Patienten erhielten 7 eine Chemoimmuntherapie (CIT). Die anderen 11 Patienten, deren Nachbetreuung nicht in unserer Klinik stattfand, wurden nicht mit einer systemischen Immuntherapie behandelt. Von den 11 Patienten erfolgte bei 2 Patienten die operative Entfernung von Metastasen und ein Patient wurde bestrahlt. Die Ein- und Drei-Jahres-Überlebensraten zwischen den Gruppen unterschieden sich signifikant. Das mediane Überleben der behandelten Patienten war mit 37 Monaten signifikant gegenüber den nicht behandelten Patienten mit 10 Monaten verlängert (siehe Abbildung 9). Die Ein- und Drei-Jahres-Überlebensraten in der Gruppe mit Chemoimmuntherapie betrugen 86 % und 64 % und in der Gruppe ohne Therapie 36 % und 36 %. Beide Kurven unterschieden sich signifikant im Breslow-Test ( $p=0,05$ ) und marginal im Log-Rank-Test ( $p=0,1270$ ).

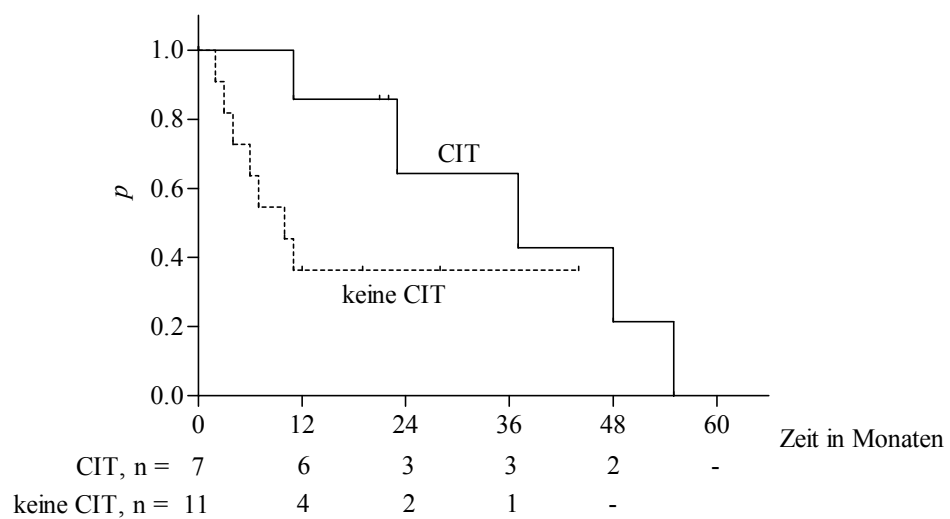


Abb. 9) Überlebenswahrscheinlichkeit bei 18 metastasierten Patienten. Das mediane Überleben betrug 37 Monate mit Chemoimmuntherapie (CIT) vs. 10 Monate ohne CIT. Die Unterschiede waren im Log-Rank-Test marginal signifikant ( $p=0,1270$ ). Im Breslow-Test wurde das Signifikanzniveau erreicht ( $p=0,0500$ ).

#### Multivariate Analyse

Die Evaluierung statistisch unabhängiger Prognosefaktoren wurde durch eine multivariate Analyse mittels Cox-Regression durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt. Lediglich das Auftreten von Metastasen ( $p=0,002$ ) erwies sich als statistisch relevanter Prognosefaktor mit einem signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten. Lymphknotenstatus und Vena-cava-Befall (Stadium III und IV) hatten keine signifikante prognostische Wertigkeit.

Tab. 14) Multivariate Analyse zum Einfluss verschiedener Faktoren auf das Überleben der Patienten (\* = signifikant).

Faktor	p-Wert	relatives Risiko	95 % CI
M1	0,002*	2,6	1,4 – 4,8
Vena-cava-Zapfen	0,259	1,4	0,8 – 2,8
N+	0,624	1,2	0,5 – 2,8

#### **4.1.4 Tumor M2-Pyruvatkinase (TU M2-PK) beim Nierenzellkarzinom**

Zur Charakterisierung der diagnostischen Wertigkeit der tumorspezifischen Form der Pyruvatkinase (TU M2-PK) erfolgte zunächst die Bestimmung dieses biologischen Markers bei Patienten mit lokalisierten und metastasierten urologischen Tumoren und im Vergleich dazu bei Patienten mit einer BPH in einer ersten Serie.

In der zweiten Serie erfolgte die Messung der TU M2-PK als begleitende Untersuchung bei Patienten, bei denen eine Chemoimmuntherapie durchgeführt wurde, um die Eignung des Biomarkers als Verlaufsparmeter beim metastasierten NZK zu ermitteln.

In der ersten Serie bestanden keine statistisch signifikanten Differenzen in der Gruppe gesunder Probanden zwischen Frauen ( $22,0 \pm 9,7$  kU/l) und Männern ( $22,3 \pm 17,1$  kU/l), so dass die beiden Gruppen als eine Kontrollgruppe ( $22,1 \pm 13,4$  kU/l) zusammengefasst werden konnten. Es bestand eine Normalverteilung ( $p < 0,05$ , Kolmogorov-Smirnov-Test). Die 95%ige obere Referenzgrenze betrug 44,2 kU/l.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Daten der Patienten mit Nierenzell-, Urothel- und Prostatakarzinomen sowie benignen Prostatahyperplasien analysiert und in Abbildung 10 dargestellt.

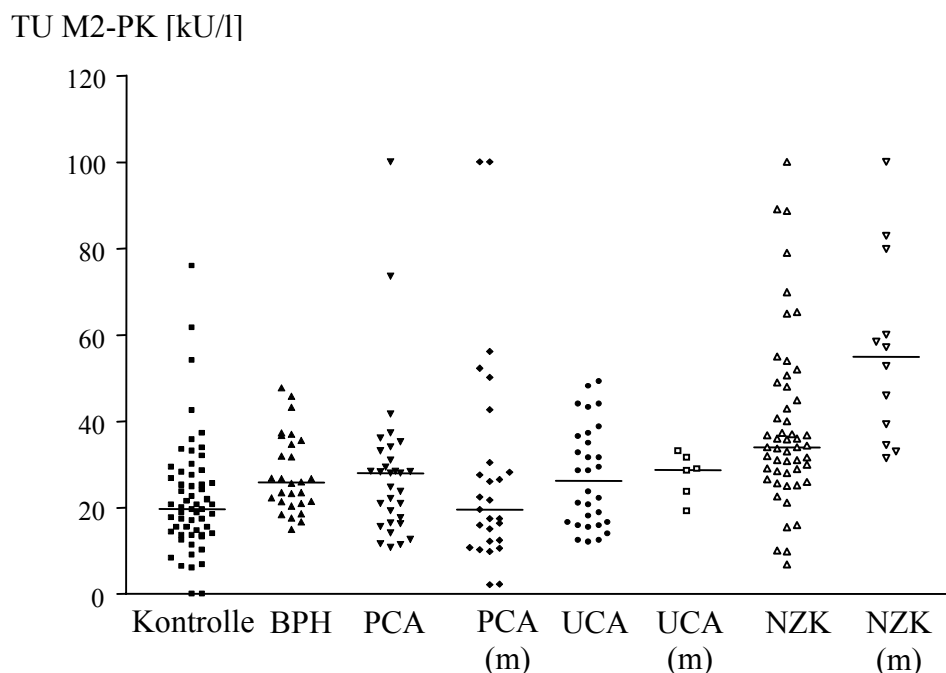


Abb. 10) Übersicht der Konzentrationen der TU M2-PK im Plasma von Kontrollpersonen und Patienten mit BPH, Prostatakarzinom (PCA), Urothelkarzinom (UCA) und Nierenzellkarzinom (NZK), (m – metastasiert). Es sind Einzelwerte und Mediane dargestellt. Signifikante Unterschiede bestanden nur bei den Nierenzellkarzinomgruppen untereinander und zu den Kontrollpersonen.

Der einzige statistische Unterschied zwischen gesunden Kontrollen und den anderen Gruppen wurde beim NZK detektiert. Beim lokalisierten, nicht-metastasierten NZK war die TU M2-PK signifikant erhöht ( $39,0 \pm 19,9$  kU/l vs.  $22,1 \pm 13,4$  kU/l, Median von 34,0 kU/l vs. Median von 19,5 kU/l,  $p < 0,001$ ). Beim metastasierten NZK waren die Unterschiede noch deutlicher und signifikante Erhöhungen des Markers bestanden sowohl für die Kontrollgruppe ( $56,3 \pm 21,8$  kU/l vs.  $22,1 \pm 13,4$  kU/l, Median von 55,0 kU/l vs. Median von 19,5 kU/l,  $p < 0,001$ ), aber auch zur Gruppe des nicht-metastasierten NZK ( $56,3 \pm 21,8$  kU/l vs.  $39,0 \pm 19,9$  kU/l, Median von 55,0 kU/l vs. Median von 34,0 kU/l,  $p < 0,05$ ).

Es bestand eine zusätzliche, signifikante Abhängigkeit des Markers zur T-Klassifikation des Primärtumors. Bei Patienten mit einem T2-NZK betrug die TU M2-PK  $32,4 \pm 10,4$  kU/l im Vergleich zu  $51,9 \pm 34,1$  kU/l bei Patienten mit einem T3-Karzinom ( $p < 0,05$ ).

Basierend auf der 95%igen oberen Referenzgrenze lag die Sensitivität der TU M2-PK beim nicht-metastasierten NZK jedoch nur bei 27,5 %, beim metastasierten NZK betrug die Sensitivität 66,7 %.

Für die beiden anderen urologischen Tumorentitäten konnten keine signifikanten Unterschiede, sowohl bei der nicht-metastasierten, als auch bei der metastasierten Erkrankung festgestellt werden (siehe Abbildung 10). Bei Patienten mit BPH bestanden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe bzw. zur Gruppe der Patienten mit Prostatakarzinomen.

In der zweiten Untersuchungsserie konnten TU M2-PK-Werte von insgesamt 68 Patienten mit metastasierten NZK nach Tumornephrektomie und vor Behandlung der Metastasen analysiert werden. Die Daten wurde hinsichtlich der Anzahl positiver, d.h. oberhalb des angegebenen Cut-off von 15 kU/l gelegener Werte, dem Unterschied zwischen synchroner und metachroner Metastasierung, der Tumormasse, dem Geschlecht der Patienten, der Anzahl befallener Organsysteme, dem histologischen Subtyp, dem Grading des Primärtumors und der Relation zwischen dem Tumormarker und dem Ansprechen auf die Therapie hin untersucht.

Der Mittelwert der TU M2-PK betrug bei den insgesamt 68 Patienten  $32,4$  kU/l  $\pm$   $35,5$  kU/l (Median von 22,9 kU/l). Bei 48 Patienten waren die Werte höher als der empfohlene Cut-off von 15 kU/l (Sensitivität 71 %) und haben damit die metastasierte Erkrankung detektiert (siehe Abbildung 11).



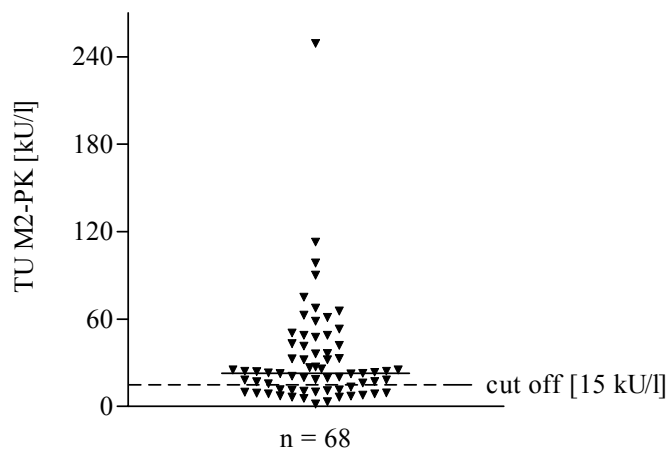


Abb. 11) Darstellung aller 68 TU M2-PK-Werte (Einzelwerte und Median). Bei 48 Patienten lag der Wert oberhalb des empfohlenen Cut-offs von 15 kU/l, was einer Sensitivität von 71 % entspricht.

Es konnte ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der zellulären Differenzierung zwischen G2 und G3 Nierenkarzinomen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12). Die TU M2-PK-Werte bei G2-Karzinomen lagen signifikant unter denen von G3-Karzinomen ( $28,2 \text{ kU/l} \pm 24,1 \text{ kU/l}$  vs.  $52,8 \text{ kU/l} \pm 55,2 \text{ kU/l}$ , Median von  $21,7 \text{ kU/l}$  vs. Median von  $37,0 \text{ kU/l}$ ,  $p = 0.0198$ , Mann-Whitney-Test).

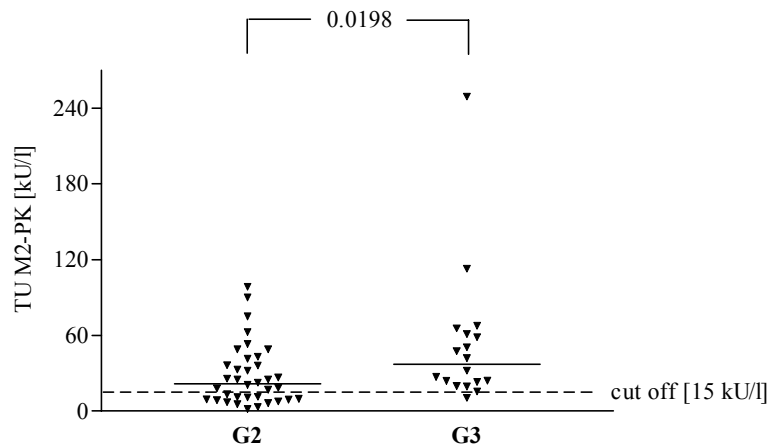


Abb. 12) Darstellung des signifikanten Unterschiedes zwischen G2 ( $n = 36$ ) und G3 ( $n = 18$ ) Nierenzellkarzinomen. Bei 2 Patienten lag ein G1-Karzinom vor und bei 12 Patienten war das primäre Grading nicht bekannt.

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den 24 Patienten mit einer synchronen Erkrankung und den 44 Patienten mit einer metachronen Erkrankung ( $45,1 \text{ kU/l} \pm 51,8 \text{ kU/l}$  vs.

25,5 kU/l  $\pm$  19,7 kU/l, Median von 23,7 kU/l vs. Median von 22,7 kU/l). Bei 30 von 44 Patienten (68 %) waren die TU M2-PK-Werte zum Zeitpunkt der Diagnose von Metastasen über den Cut-off erhöht.

Der Unterschied zwischen Patienten mit einer geringen (n = 22) und hohen (n = 46) Tumormasse waren nur als Tendenz erkennbar (21,0 kU/l  $\pm$  12,8 kU/l vs. 37,9 kU/l  $\pm$  41,3 kU/l, Median von 21,4 kU/l vs. Median von 23,7 kU/l). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl der metastasierten Organsysteme, dem histologischen Subtyp des Primärtumors und dem Geschlecht der Patienten.

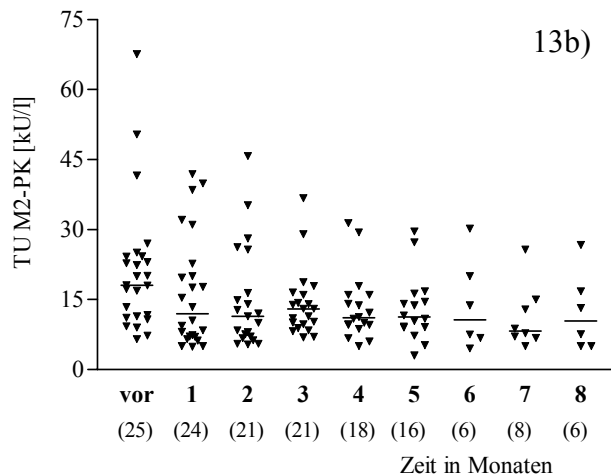
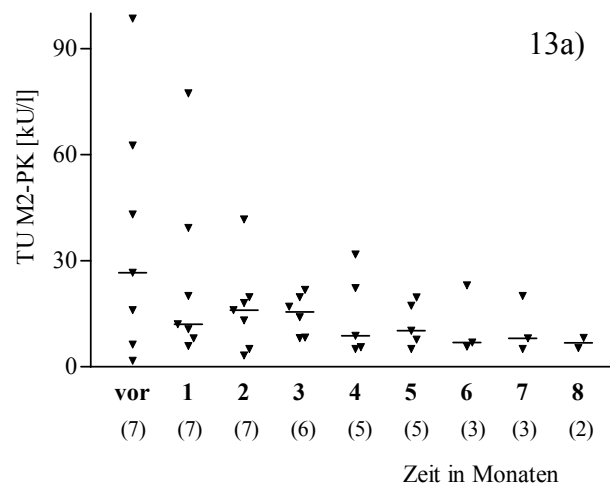
Tabelle 15 demonstriert die verschiedenen Sensitivitäten, die auf der Basis des empfohlenen Cut-offs berechnet wurden. Danach betrug die Sensitivität insgesamt 71 %. Die Sensitivität war am höchsten bei den nicht-behandelten Patienten (94 %), bei Patienten mit einem schlechten Grading (94 %) und bei Patienten mit einer erneuten Progression der Erkrankung nach Chemoimmuntherapie (100 %).

Tab. 15) Sensitivität der TU M2-PK bei den verschiedenen Subgruppen der Patienten.

	n	Sensitivität
alle Patienten	68	71 %
metachrone Patienten	44	68 %
synchrone Patienten	24	75 %
unbehandelte Patienten	18	95 %
G2 Karzinome	36	61 %
G3 Karzinome	18	94 %
behandelte Patienten	50	62 %
erneute Progression	9	100 %

Die Analyse der TU M2-PK-Verläufe unter Chemoimmuntherapie war eine weiterer, wesentlicher Aspekt der zweiten Untersuchungsreihe. Die nach jedem Therapiezyklus durchgeführten Staging-Untersuchungen der 50 Patienten ergaben bei 4 Patienten komplette Remissionen (CR), bei 8 Patienten partielle Remissionen (PR) und bei 26 Patienten einen stabilen Erkrankungsverlauf. 12 Patienten sprachen auf die Chemoimmuntherapie primär nicht an (PD). Von den 4 CR-Patienten waren 3 primär TU M2-PK-negativ und blieben auch im weiteren Zeitraum der Nachbeobachtung negativ (Daten nicht dargestellt). Die Daten bei den 8

PR-Patienten zeigten im Verlauf eine Tendenz zu absteigenden Werten der TU M2-PK, die Unterschiede waren jedoch über den Verlauf von 8 Monaten nicht signifikant (siehe Abbildung 13a). Bei den Patienten mit einer Stabilisierung blieben die TU M2-PK-Werte, entsprechend der radiologischen Ergebnisse der Staging-Untersuchungen über 8 Monate unverändert (siehe Abbildung 13b). Die Patienten mit einer Progression unter Chemoimmuntherapie wiesen keine signifikanten Veränderungen des Tumormarkers über den Zeitraum von 5 Monaten auf (siehe Abbildung 13c).



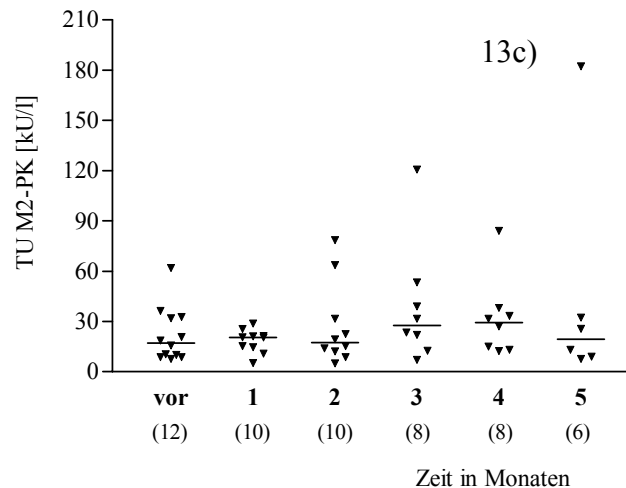


Abb. 13) Verläufe der TU M2-PK Untersuchungen unter Chemoimmuntherapie, 13a – Patienten mit PR, 13b – Patienten mit SD, 13c – Patienten mit PD, in Klammern die jeweilige Probenanzahl zum Untersuchungszeitpunkt.

Bei 9 Patienten kam es nach Chemoimmuntherapie zu einer erneuten Progression der Erkrankung. Diese Patienten wiesen alle TU M2-PK-Werte oberhalb des Cut-offs von 15 kU/l auf (Mittelwert  $53,2 \text{ kU/l} \pm 36,3 \text{ kU/l}$ , Median von  $31,0 \text{ kU/l}$ , Sensitivität 100 %, siehe Tabelle 15).

Auf der Basis der Verlaufsuntersuchungen wurde der positive Vorhersagewert (positiver prädiktiver Wert), definiert als Relation der Anzahl richtig positiver Werte während der Nachbeobachtung zu der Anzahl aller Werte der Nachbeobachtung inklusive falsch positiver Werte, berechnet. Als falsch positive Werte wurden diejenigen Werte bezeichnet, bei denen keine Korrelation mit den Resultaten der Staging-Untersuchungen vorlagen. Der positive prädiktive Wert der Verlaufsuntersuchungen für alle Patienten ( $n = 50$ ) betrug 0,68.

## **4.2 Experimenteller Teil**

### **4.2.1 Zellmembranexpression des induzierbaren 72 kDa Hitzeschockproteins beim Nierenzellkarzinom**

Die Untersuchungen hatten das Ziel, die basale und stressinduzierte Zellmembranexpression des induzierbaren 72 kDa HSP auf Zelllinien und Primärkulturen zu untersuchen und Zusammenhänge zwischen der HSP72-Membranexpression und der Lyse durch IL-2-stimulierter NK-Zellen herzustellen.

Zunächst wurden Untersuchungen an den Zelllinien ACHN (humanes Nierenzellkarzinom) und PC-3 (humanes Prostatakarzinom) durchgeführt. Die Induktion der HSP-Synthese erfolgte durch eine Hyperthermieexposition von 41,8 °C für 180 Minuten mit einer Erholungsphase von 16 bis 18 Stunden.

Nach nicht-letaler Hyperthermieexposition konnte an ACHN, kaum jedoch an PC-3-Zellen durchflusszytometrisch eine HSP72-Expression auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Abbildung 14 zeigt charakteristische Beispiele für beide Zelllinien.

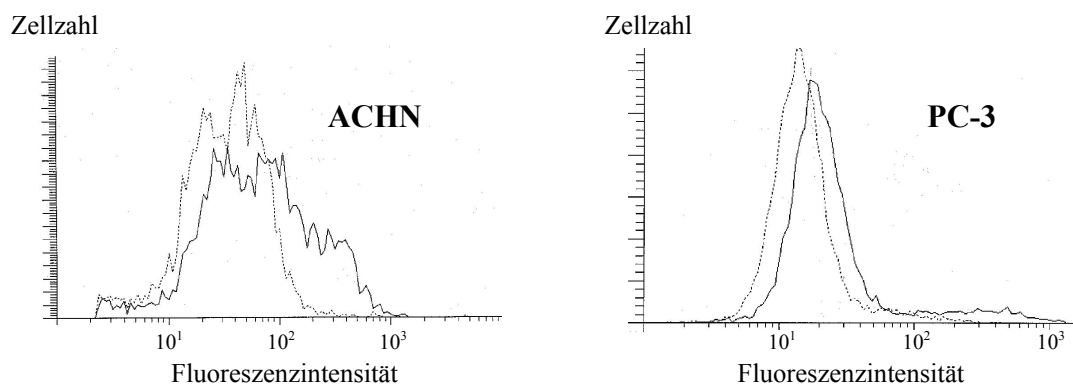


Abb. 14) Logarithmische Darstellung der Fluoreszenzintensität bei ACHN und PC-3 Zellen nach nicht-letaler Hyperthermieexposition von 41,8 °C für 180 Minuten (—) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (.....). Während bei ACHN Zellen eine Zunahme der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen war, blieb das Signal bei PC-3 Zellen nahezu unverändert.

Die durchflusszytometrischen Daten der ACHN Zellen konnten durch Western-Blots mit aufgereinigten Zellmembranfraktionen bestätigt werden. Abbildung 15 zeigt die entsprechenden Ergebnisse.

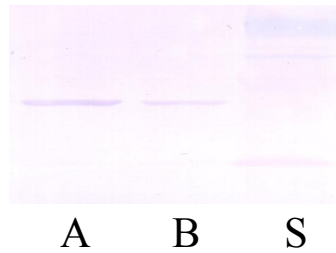


Abb. 15) HSP72-Western-Immunoblots von einem Lysat hyperthermierter ACHN-Zellen als positive Kontrolle (nach Hyperthermie von 43,5 °C für 60 Minuten (A) und gepoolter Membranfraktionen von ACHN-Zellen nach nicht-letaler Hyperthermie von 41,8 °C für 180 Minuten (B). Die Erholungsphase betrug jeweils 16 Stunden. Säule S repräsentiert molekulare Markerproteine als Standard.

In weiteren Versuchen wurde die Abhängigkeit der HSP72-Membranexpression von einer passiven Inkubation mit HSP72 untersucht. Die passive Inkubation von ACHN-Zellen erfolgte mit einem Lysat hyperthermierter ACHN-Zellen, um den möglichen Einfluss einer passiven Anlagerung von HSP72 an die Zellmembranen intakter, hyperthermierter Zellen zu prüfen. Die Ergebnisse sind als linearisierter Mittelwert der Fluoreszenzintensität in Prozent bezogen auf die Kontrolle von jeweils 3 unabhängigen Experimenten in Abbildung 16 dargestellt.

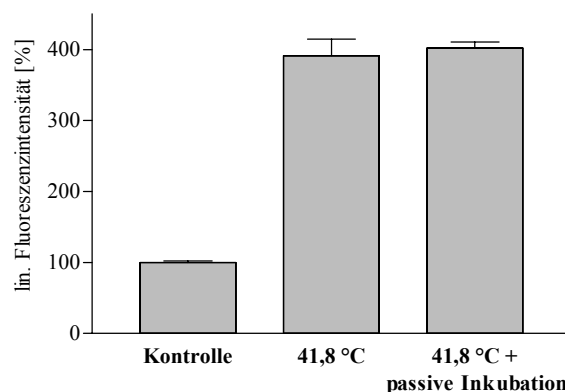


Abb. 16) Darstellung der linearisierten Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten als Prozent bei Kontrollen und hyperthermierten ACHN-Zellen und jeweiliger passiver Inkubation mit HSP72. Die Fluoreszenzintensität der Kontrollen wurde 100 % gesetzt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden zwischen den hyperthermierten Zellen und den Zellen, die neben der Hyperthermie noch passiv mit HSP72 inkubiert worden waren.

Nachfolgend wurde die zeitliche Dynamik der HSP72-Membranexpression auf den ACHN-Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit einer Hyperthermie von 41,8 °C für 180 Minuten behandelt und nach 0, 2, 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden gesammelt, durchflusszytometrisch untersucht und mit nicht-hyperthermierten Kontrollzellen verglichen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 als linearisierte Mittelwerte der Fluoreszenzintensität in Prozent bezogen auf den Ausgangswert nicht-hyperthermierter Kontrollzellen dargestellt.

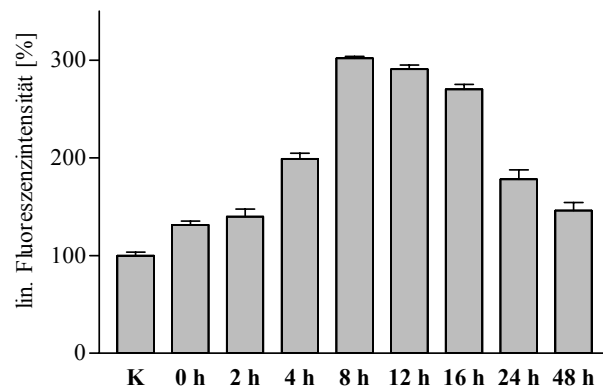


Abb. 17) Zeitliche Dynamik der HSP72-Membranexpression auf ACHN-Zellen gemessen zwischen 0 bis 48 Stunden nach Hyperthermiebehandlung. Es zeigte sich ein Maximum im Bereich von 8 bis 16 Stunden (K=nicht-hyperthermierte Kontrolle).

Um zu überprüfen, ob die Hyperthermieapplikation einen Einfluss auf die Präsentation von MHC-Molekülen und damit potentiell auf die Lyse durch NK-Zellen hat, wurde der zeitliche Verlauf der MHC-Expression nach Hyperthermieexposition mit dem gleichen Protokoll ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

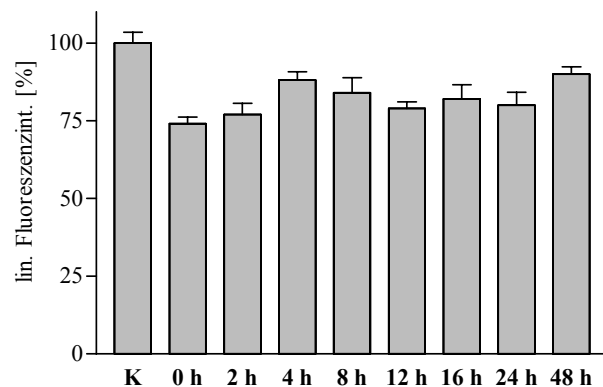


Abb. 18) Zeitliche Dynamik der MHC-Expression auf ACHN-Zellen zwischen 0 bis 48 Stunden. Der Vergleich mit dem Ausgangswert nicht-hyperthermierter Zellen (K) zeigt, dass es insbesondere zum den Zeitpunkten 0 und 2 Stunden zu einem Abfall der MHC-Expression kommt. Aufgrund von nur 2 Einzelexperimenten pro Zeitpunkt lag statistische Signifikanz nicht vor.

In weiterführenden Experimenten wurden NK-Zellen von zwei gesunden Probanden durch negative Selektion angereichert, für 72 Stunden in IL-2 kultiviert und für Lyseexperimente

genutzt. Die Abbildung 19 demonstriert das durchflusszytometrische Ergebnis der NK-Zellanreicherung für 2 charakteristische Versuche.

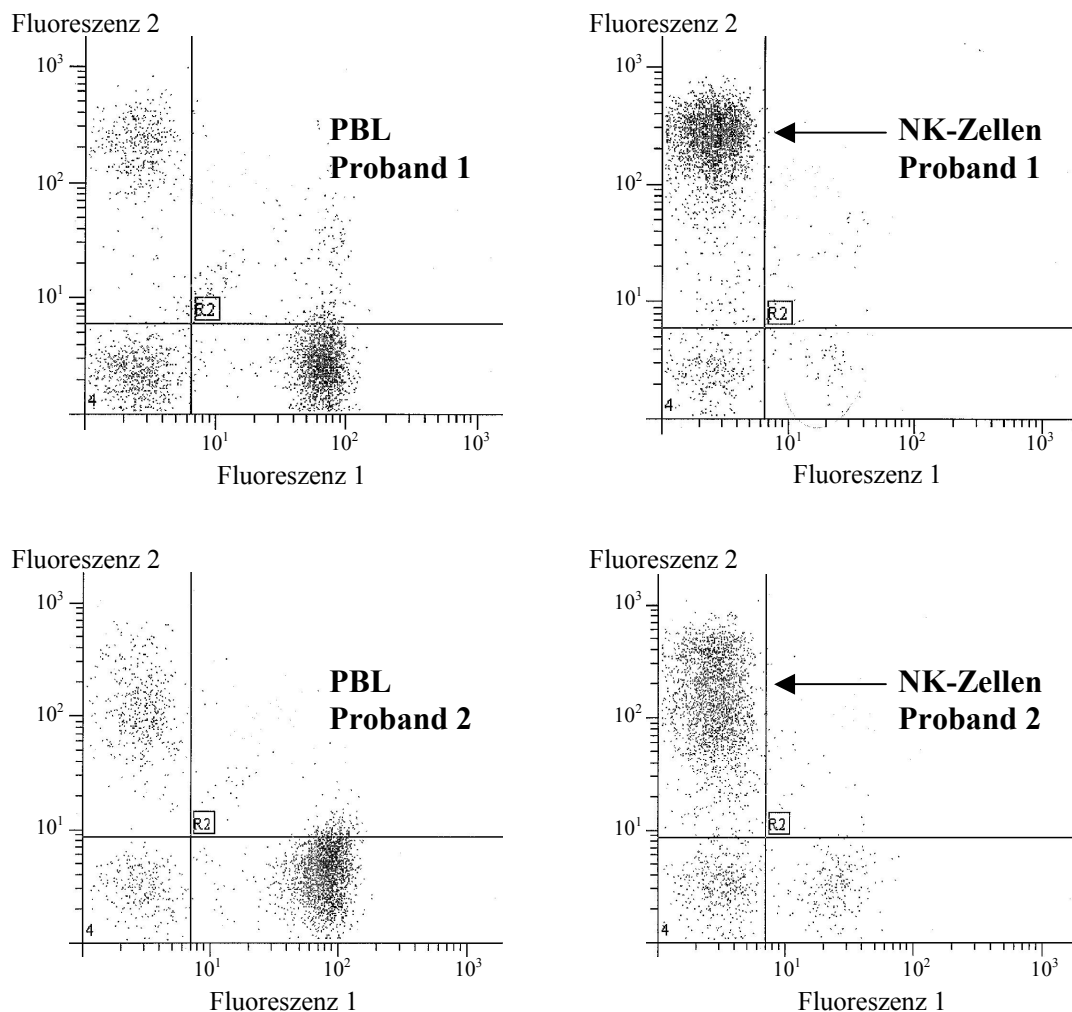


Abb. 19) Anreicherung von NK-Zellen aus peripherem Blut (PBL=periphere Blutlymphozyten) durch negative Selektion und Nachweis mit der Simultest-Lösung (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Bei Proband 1 gelang eine Anreicherung von 14,6 % auf 76,8 % (obere Bilder) und bei Proband 2 von 14,0 % auf 87,5 % (untere Bilder).

Die Ergebnisse der Lyseexperimente sind nachfolgend dargestellt. Hierzu wurden nach 3tägiger Inkubation mit IL-2 die NK-Zellen mit hyperthermierten und nicht-hyperthermierten ACHN- oder PC-3-Zellen in verschiedenen Effektor- und Zielzellkonzentrationen koinkubiert und dann die Zielzelllyse mit einem Assay bestimmt, das auf der LDH-Freisetzung aus den Zielzellen beruht.



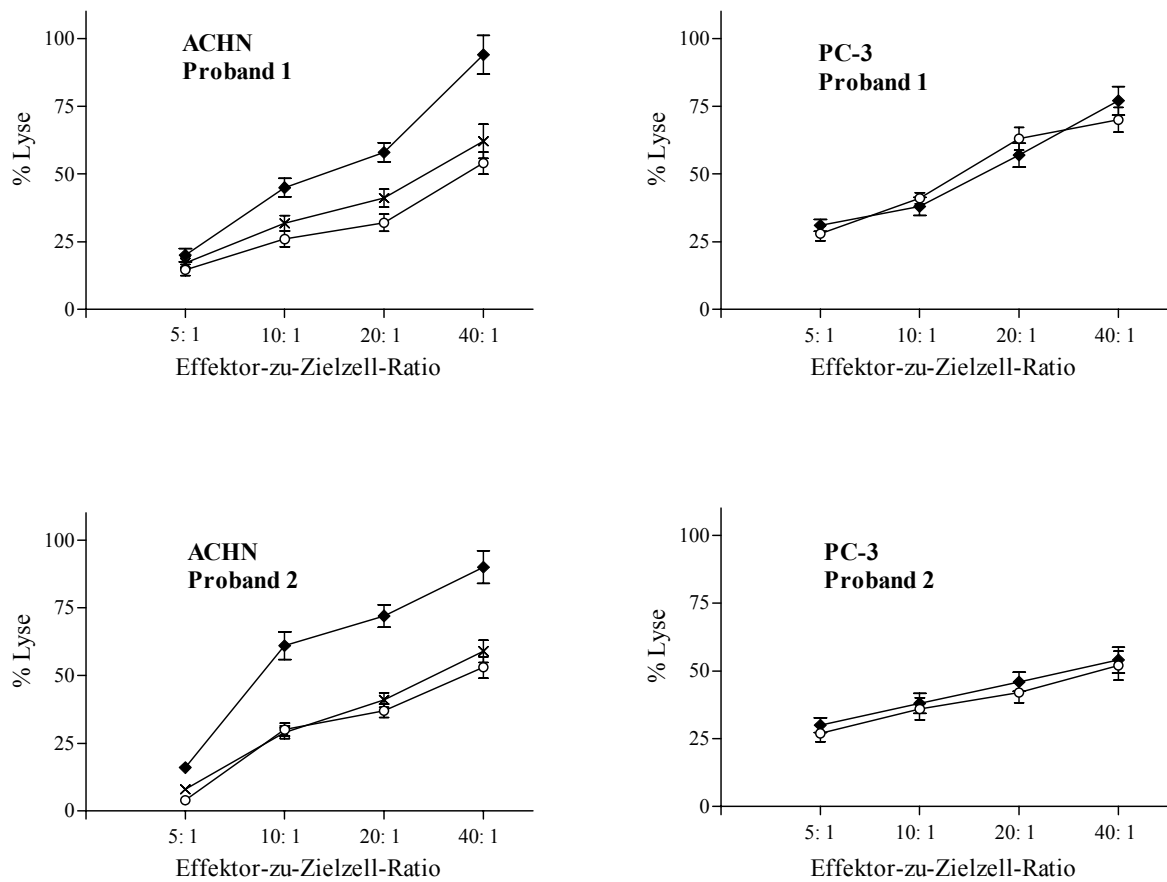


Abb. 20) Lyseexperimente mit hyperthermierten und nicht-hyperthermierten ACHN- und PC-3-Zellen als Zielzellen und IL-2-stimulierten NK-Zellen von 2 Probanden (—◆— Kontrolle, —○— Hyperthermie, —×— mAb-blockiert).

HSP72-positive, hyperthermierte Zellen wurden signifikant stärker lysiert als die nicht-hyperthermierten Kontrollen (ANOVA, Mann-Whitney-Test,  $p < 0,05$ ). Wenn HSP72 mit einem monoklonalen Antikörper neutralisiert wurde, ging die Lyse wieder fast auf das Ausgangsniveau zurück. Bei den HSP72-negativen PC-3-Zellen gab es zwischen hyperthermierten und nicht-hyperthermierten Zellen keine Unterschiede.

Auf der Basis der an der Nierenkarzinomlinie nachgewiesenen Präsenz des stressinduzierbaren HSP72 auf der Zelloberfläche und der damit verbundenen erhöhten Lyse durch IL-2-stimulierte NK-Zellen erfolgte in weiteren Untersuchungen die Analyse von HSP72 auf der Zelloberfläche von kurzzeitkultivierten primären Nierenkarzinomzellen. Insgesamt wurden die Tumorzellen von 29 Patienten untersucht. Bei 16 von den 29 Patienten wurden gleichzeitig auch normale renale Zellen untersucht. Die epitheliale Herkunft der Tumor- und Normalzellen wurde

immunhistochemisch mit einem anti-Zytokeratin-18-Antikörper bei jeder 5. Probe verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Die Abbildung 21 demonstriert die durchflusszytometrischen Ergebnisse von zwei repräsentativen Einzelzellsuspensionen von Tumorzellen jeweils basal und nach nicht-letaler Hyperthermieexposition von 41,8 °C für 3 Stunden.

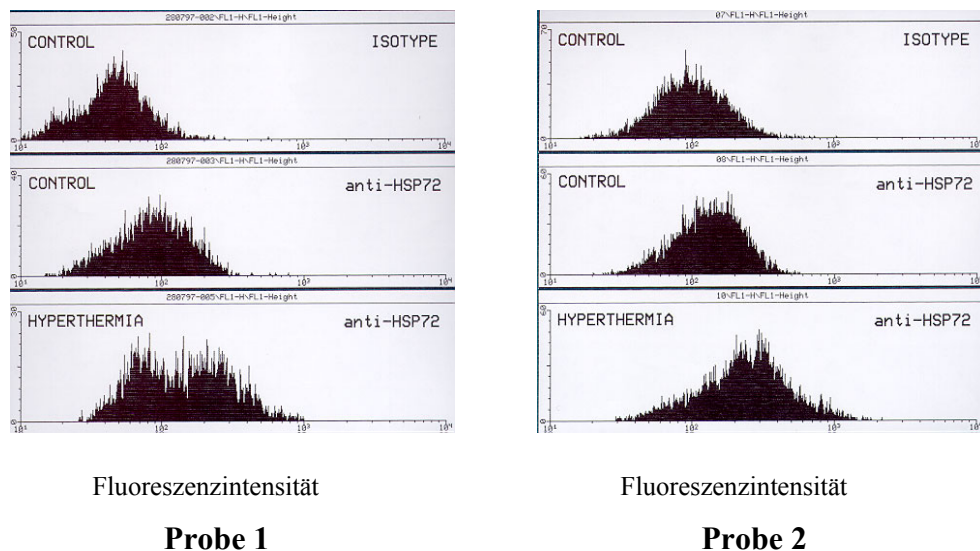


Abb. 21) Darstellung der basalen und hyperthermieinduzierten HSP72-Expression auf Nierenkarzinomzellen. Bei Probe 1 lässt sich eine deutliche basale Expression mit einer nochmaligen Steigerung nach Hyperthermie im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle nachweisen. Bei Probe 2 ist die basale Expression gering, nach Hyperthermie kommt es jedoch auch hier zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität.

Für insgesamt 29 Einzelzellsuspensionen von Karzinomzellen wurden entsprechende Untersuchungen durchgeführt und die basale und hyperthermieinduzierte HSP72 Expression im Vergleich zu Isotyp-Kontrollen ermittelt. Abbildung 22 zeigt die Daten der 29 Proben.

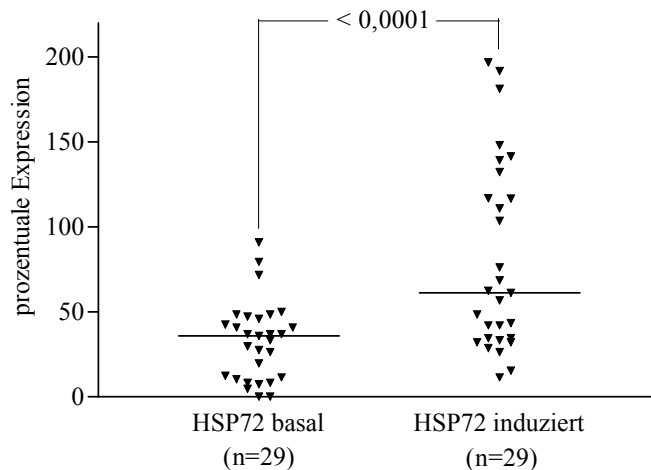


Abb. 22) Basal wiesen 27 Proben eine HSP72-Expression im Vergleich zu den Isotyp-Kontrollen auf. Die Hyperthermieexposition führte zu einer signifikanten Steigerung der HSP72-Expression ( $p < 0,0001$ , Wilcoxon-matched-pairs-Test).

Des Weiteren wurde aus den Basisdaten das Ausmaß der HSP-Induktion berechnet (siehe Abbildung 23).

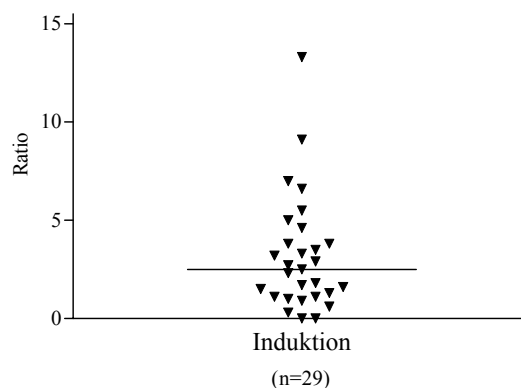


Abb. 23) Aus den Daten der basalen und stressinduzierten HSP72-Expression wurde der jeweilige Faktor der Intensitätserhöhung ermittelt (0- bis 13,3fach).

Die Daten wurden weiterhin auf Zusammenhänge mit der TNM-Klassifikation und dem Grading des Primärtumors untersucht. Bezüglich N-Kategorie und Grading gab es keine signifikanten Beziehungen. Bei der T-Kategorie gab es Unterschiede zwischen T1 und T2/3 Nierenzellkarzinomen. T2/3 Tumoren wiesen basal eine tendenziell, und nach Hyperthermie eine signifikant höhere HSP72-Membranexpression auf (siehe Abbildung 24). Das Ausmaß der Induktion war von der T-Kategorie unabhängig.

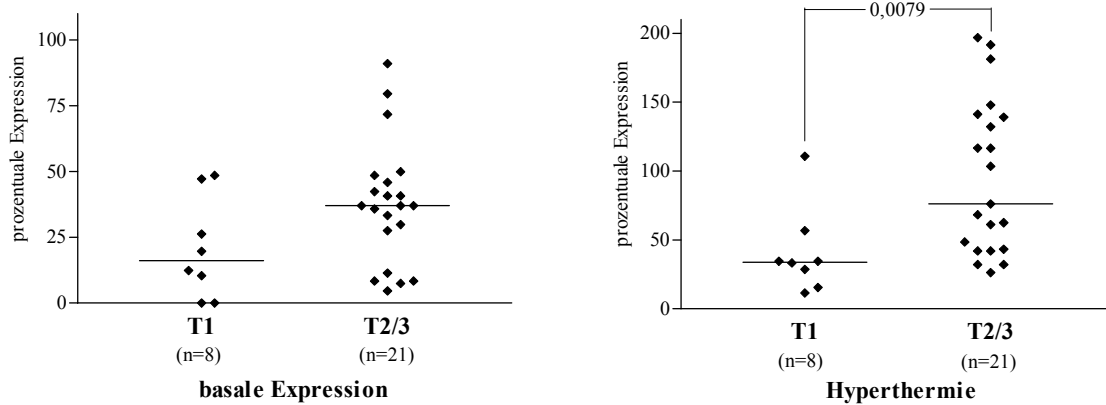


Abb. 24) HSP72-Membranexpression in Abhängigkeit von der T-Kategorie (Mann-Whitney-Test,  $p=0,0079$ ).

Bei einer Metastasierung zeichnete sich eine tendenziell geringere basale HSP72-Expression ab. Die Unterschiede waren signifikant nach Hyperthermieapplikation (siehe Abbildung 25). Auch hier ergab sich kein Zusammenhang zum Faktor des Anstieges der HSP72-Expression.

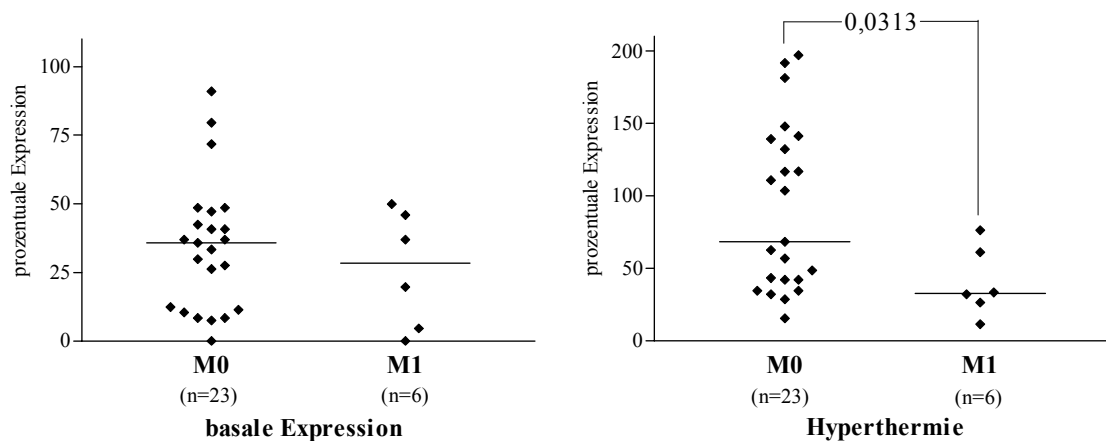


Abb. 25) HSP72-Membranexpression in Abhängigkeit von der Metastasierung (Mann-Whitney-Test,  $p=0,0313$ ).

Des Weiteren wurde untersucht, ob die HSP72-Membranexpression einen Einfluss auf das Überleben der Patientengruppe haben könnte. Dabei wurden die basale und die Hyperthermie-induzierte Membranexpression sowie der Faktor des Anstieges analysiert.

Unter Anwendung verschiedener Cut-offs ergaben sich keine signifikanten Beziehungen zwischen dem Überleben und der basalen HSP72-Expression sowie dem Faktor der HSP-Induktion.

Dagegen war bei einem Cut-off von  $> 100\%$  die Hyperthermie-induzierte HSP72-Expression mit einem signifikant verlängerten Überleben assoziiert (siehe Abbildung 26,  $p=0,0369$ , Log-Rank-Test).

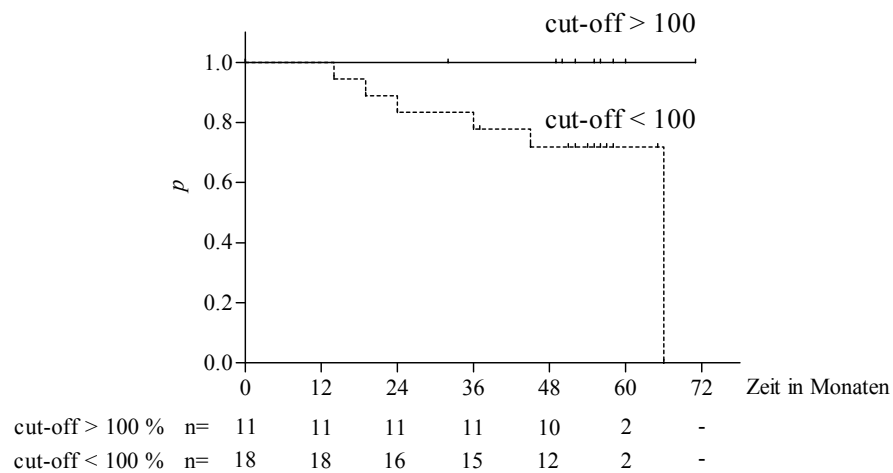


Abb. 26) Überleben der Patienten in Abhängigkeit der hyperthermieinduzierten HSP72-Membranexpression. Das mediane Überleben betrug 66 Monate in der Gruppe  $HSP72 < 100\%$  und wurde in der anderen Gruppe in der Nachbeobachtungsphase nicht erreicht ( $p=0,0369$ , Log-Rank-Test).

Die Expression von MHC-Molekülen wurde ebenfalls untersucht. Hier zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen nicht-behandelten und hyperthermierten Zellen (Abbildung 27,  $p=0,4143$ ).

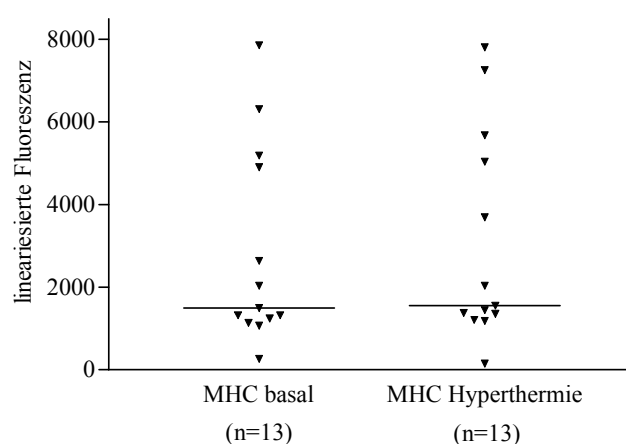


Abb. 27) Darstellung der basalen und Hyperthermie-induzierten Expression ( $41,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 180min) von MHC-Molekülen an Nierenkarzinomzellen. Die Unterschiede sind nicht signifikant ( $p=0,4143$ , Wilcoxon-matched-pairs-test).

Es wurden zusätzlich 15 benigne Proben bezüglich der HSP72-Expression untersucht. Diese Proben repräsentieren gesundes Nierengewebe. Abbildung 28 zeigt, dass auch bei diesen Proben eine basale und Hyperthermie-induzierte HSP72-Expression nachzuweisen war.

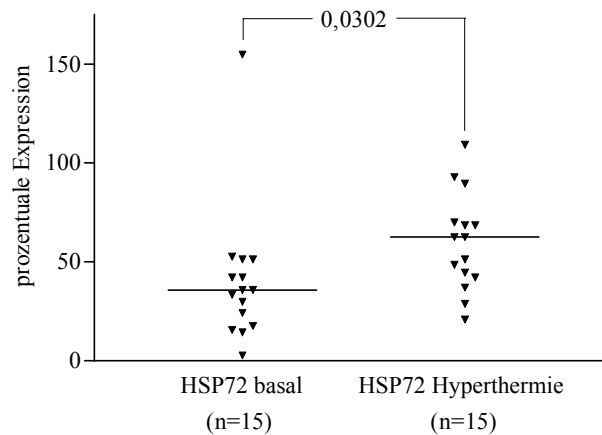


Abb. 28) Basale und stressinduzierte HSP72-Expression an benignen epithelialen Nierenzellen ( $p=0,0302$ , Wilcoxon-matched-pairs-test).

#### **4.2.2 Zytoplasmatische Expression des induzierbaren 72 kDa Hitzeschockproteins beim Nierenzellkarzinom**

In der vorliegenden Untersuchung wurden 53 Präparate von Patienten mit Nierenzellkarzinomen und 10 Präparate von Metastasen des NZK und 17 tumorfreie Präparate mit Normalgewebe immunhistochemisch bezüglich der Expression von HSP72 untersucht.

In den Präparaten mit normalen Gewebeabschnitten waren die Tubuluszellen konstant angefärbt. Vereinzelt wurden auch solitäre Zellen in den Glomerula angefärbt. Alle anderen Strukturen des normalen Nierengewebes zeigten keine HSP72-Expression.

Das Nierenzellkarzinomgewebe wies eine heterogene HSP72-Expression auf. Das Verhalten in den Metastasen vom NZK zeigte ein ähnliches Expressionsmuster.

Die nachfolgenden Abbildungen demonstrieren die unterschiedlich starken anti-HSP72-Anfärbungen in normalem Nierengewebe und in den beschriebenen 4 Ausprägungsgraden in Karzinomarealen (siehe Kapitel 3.6.4, Seite 40), und am Beispiel einer repräsentative Metastase.

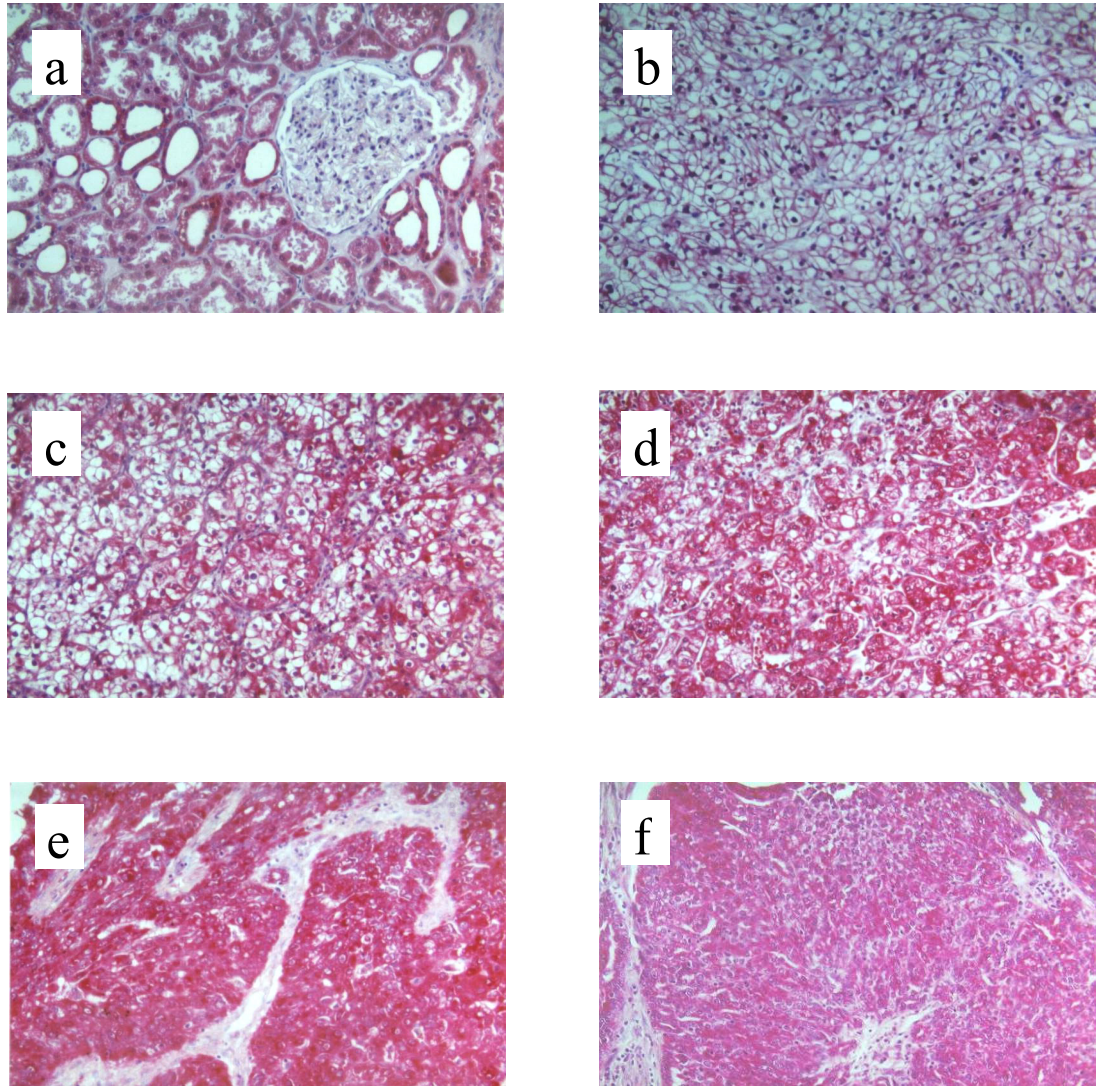


Abb. 29) Darstellung repräsentativer Färbungen in Nierengewebe je nach Ausprägungsgrad (200fache Vergrößerung): a – Normalgewebe mit HSP72-Expression in den Tubulusepithelzellen; b – Karzinomgewebe ohne HSP72-Expression (Intensitätsgrad 0); c – Karzinomgewebe mit schwacher Expression (Intensitätsgrad 1), d – Karzinomgewebe mit mäßiger Expression (Intensitätsgrad 2); e – Karzinomgewebe mit starker Expression (Intensitätsgrad 3); f – pulmonale Metastase mit starker Expression (Intensitätsgrad 3).

In der weiteren Auswertung wurden die arithmetischen Mittelwerte der HSP72-Expression verwendet und mit Tumor- und Patientenparametern korreliert.

Die mittlere HSP72-Expression im Karzinomgewebe der 53 Proben betrug  $1,47 \pm 0,7$ . Im Vergleich dazu lagen die Werte bei den 10 Metastasen (5 Lungenmetastasen, 3 ossäre Metastasen, eine Metastase in der Restniere und eine Metastase im Omentum majus) bei  $1,54 \pm$

0,69. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Primärtumoren und den Metastasen.

Es bestand keine Korrelation zwischen der HSP72-Expression und dem Alter bzw. dem Geschlecht der Patienten (Daten nicht gezeigt).

Ebenso zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der HSP72-Expression und der T-Kategorie sowie dem Grading des Primärtumors (Daten nicht gezeigt).

Auch der histologische Typ (hellzellige versus nicht-hellzellig) wies keine signifikanten Beziehungen zur HSP72-Expression auf (Daten nicht gezeigt).

Bezüglich der Metastasierung wurden einerseits Patienten mit Lymphknotenmetastasen und andererseits Patienten mit Fernmetastasen unterschieden.

Bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen war die HSP72-Expression nicht signifikant gegenüber Patienten ohne Lymphknotenmetastasen verändert.

Signifikante Unterschiede fanden sich jedoch beim Vergleich von Patienten ohne Fernmetastasen gegenüber Patienten, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose oder im weiteren Verlauf der Erkrankung Fernmetastasen entwickelten. Die 17 Patienten ohne Metastasen wiesen signifikant höhere Werte der HSP72-Expression auf als 36 Patienten mit Metastasen (Mittelwert von  $1,85 \pm 0,41$  vs. Mittelwert von  $1,29 \pm 0,74$ ). Das Signifikanzniveau betrug im Mann-Whitney-Test 0,0052 (siehe Abbildung 30).

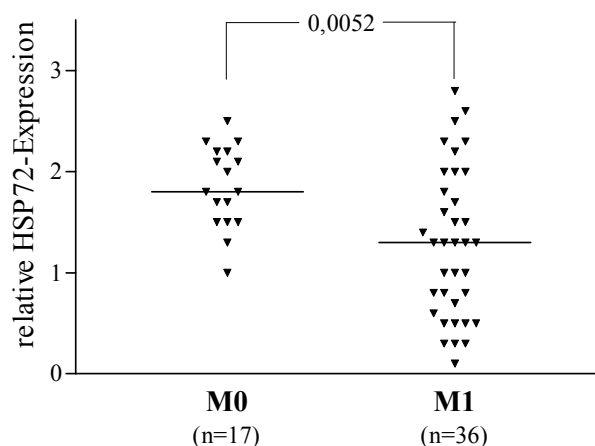


Abb. 30) Darstellung der HSP72-Expression bei Patienten ohne (M0) und mit (M1) Fernmetastasen. Es wurden Einzelwerte und Mediane abgebildet.

Zusätzlich wurden die 10 untersuchten Metastasen mit der jeweiligen HSP72-Expression der korrespondierenden 6 Primärkarzinome verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16



dargestellt. Zwischen Primärkarzinomen und Metastasen konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Mann-Whitney-Test,  $p=0,2198$ ).

Tab. 16) Darstellung der HSP72-Expression von Metastasen und den korrespondierenden Primärtumoren.

Kategorie	N	Mittelwert	SD	Median	Min - Max
M1	10	1,54	0,69	1,60	0,2 – 2,3
Primär-NZK	6	1,1	0,91	0,85	0,3 – 2,8

In weiteren Auswertungen wurde die HSP72-Expression der Primärtumoren von 24 Patienten mit einer metastasierten Erkrankung untersucht, die eine Chemoimmuntherapie mit IL-2, IFN- $\alpha$ 2a und 5-FU erhalten hatten. Bei den 24 Patienten wurden 4 CR (16,6 %) und 2 PR (8,4 %) erzielt. Die Rate objektiver Remissionen betrug 25,0 % mit einer medianen Dauer von 17 Monaten. Bei 18 Patienten wurden keine objektiven Remissionen registriert, 13 Patienten (54 %) hatten einen stabilen Erkrankungsverlauf mit einem medianen progressionsfreien Intervall von 8 Monaten. Bei 5 Patienten (21 %) sprach die Therapie nicht an. Die HSP72-Expression bei den 6 Patienten mit einer Remission war signifikant erhöht gegenüber 18 Patienten ohne Remission (Mittelwert von  $1,78 \pm 0,65$  vs. Mittelwert von  $0,99 \pm 0,72$ ,  $p=0,0255$ , Mann-Whitney-Test). In Abbildung 31 sind die Werte für die 24 Patienten angegeben

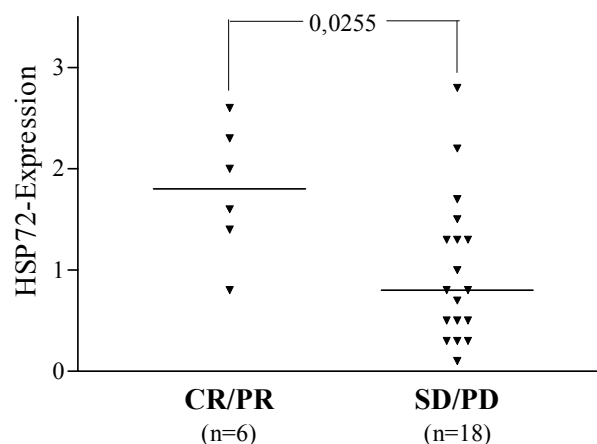


Abb. 31) Patienten mit objektiven Remissionen wiesen eine signifikant höhere HSP72-Expression auf, als Patienten die stabil blieben oder nicht auf die Therapie ansprachen. Es wurden Einzelwerte und Mediane abgebildet.

Auf der Basis der signifikanten Ergebnisse zwischen den Patienten mit einer Metastasierung und denen mit einer Chemoimmuntherapie wurden eine ROC-Analyse für beide Gruppe durchgeführt, um Cut-offs der HSP72-Expression für die eine jeweils 90 und 95%ige Sensitivität und Spezifität und die maximale Effizienz zu berechnen. Die Daten sind in den Tabellen 17 und 18 dargestellt.

Tab. 17) Beziehung zwischen Sensitivität und Spezifität verschiedener HSP72-Cut-offs für das Gesamtüberleben.

	Kalkulation für Cut-off =	Sensitivität	Spezifität	Effizienz
max. Effizienz	1,4	0,84	0,73	0,78
Sensitivität 90 %	1,5	0,89	0,63	0,73
Spezifität 90 %	0,9	0,52	0,9	0,75
<b>Sensitivität 95 %</b>	<b>1,7</b>	<b>0,95</b>	<b>0,57</b>	<b>0,71</b>
Spezifität 95 %	0,7	0,42	0,97	0,75

Tab. 18) Beziehung zwischen Sensitivität und Spezifität verschiedener HSP72-Cut-offs für das Ansprechen auf eine Chemoimmuntherapie (CR/PR vs. SD/PD).

	Kalkulation für Cut-off =	Sensitivität	Spezifität	Effizienz
max. Effizienz	1,4	0,83	0,83	0,83
<b>Sensitivität 90 %</b>	<b>1,7</b>	<b>0,89</b>	<b>0,5</b>	<b>0,79</b>
Spezifität 90 %	1,4	0,83	0,83	0,83

Da die ROC-Analyse bei einem HSP72-Cut-off von 1,7 (Fettdruck in den Tabellen 17 und 18) und mit einer Sensitivität von 95 bzw. 90 % gute Ergebnisse für die Spezifität und die Effizienz ergab, wurde dieser Cut-off für die Berechnungen des Einflusses der HSP72-Expression auf das Überleben der Patienten zu Grunde gelegt.

Mit uni- und multivariaten Analysen wurde anschließend der Einfluss verschiedener Parameter, wie:

- T-Kategorie (T1/2 versus T3/4)
- Grading (G1/2 versus G3/4)
- Lymphknotenstatus (N0 versus N1/2)
- Metastasierung (M0 versus M1)

- histologischer Subtyp (hellzellig versus nicht-hellzellig) und
- HSP72-Expression ( $\leq 1,7$  versus  $> 1,7$ )

auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten (n=52) untersucht.

In der univariaten Analyse erwiesen sich die T-Kategorie ( $p=0,0263$ , Log-Rank-Test), der Metastasierungsstatus ( $p=0,0004$ , Log-Rank-Test) und die HSP72-Expression ( $p=0,0040$ , Log-Rank-Test) als signifikant. Des Weiteren hatte die HSP72-Expression einen signifikanten Einfluss auf jene Patienten, die eine Chemoimmuntherapie erhalten hatten ( $p=0,0454$ , Log-Rank-Test). Die Daten sind in den Abbildungen 32 bis 35 dargestellt.

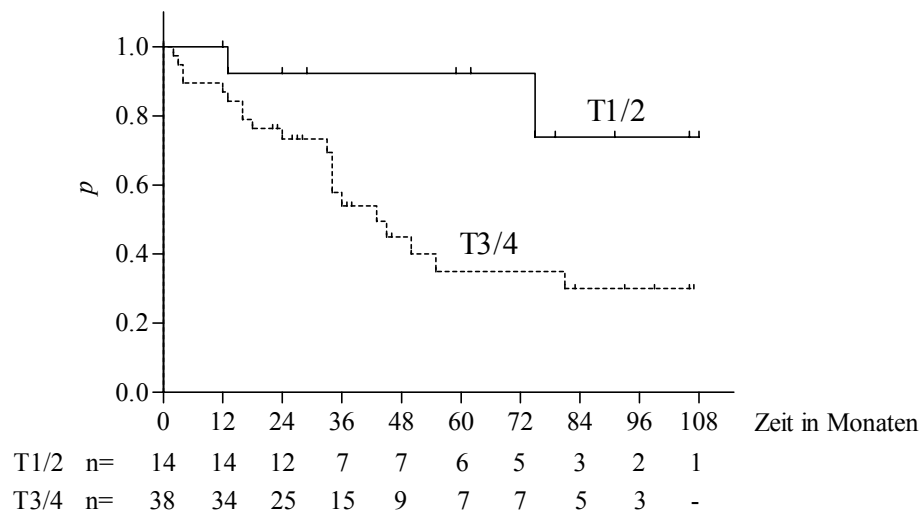


Abb. 32) Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der T-Kategorie mit Angabe der Patienten „at risk“. Das mediane Überleben für die Gruppe T1/2 wurde nicht erreicht. Es lag in der Gruppe T3/4 bei 43 Monaten, ( $p=0,0216$ , Log-Rank-Test).

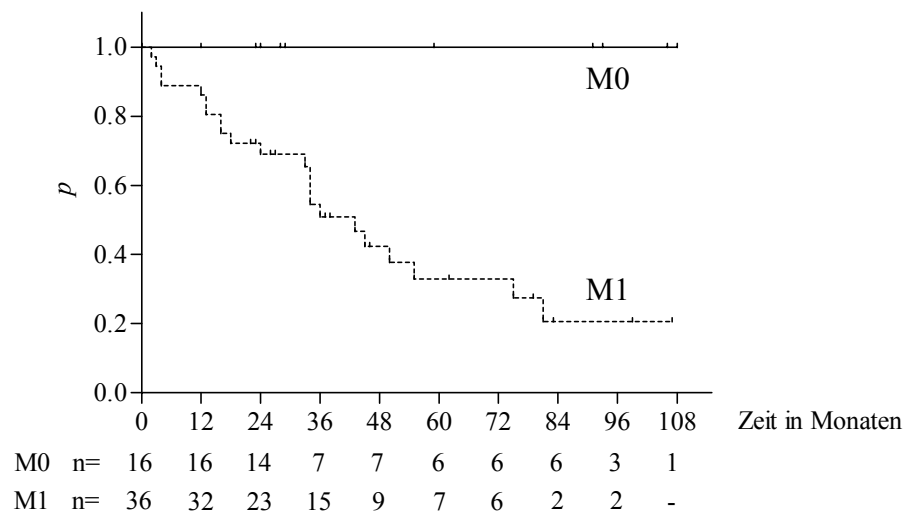


Abb. 33) Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Metastasierung mit Angabe der Patienten „at risk“. Das mediane Überleben für die Gruppe M0 wurde nicht erreicht. Es lag in der Gruppe M1 bei 43 Monaten, ( $p=0,0004$ , Log-Rank-Test).

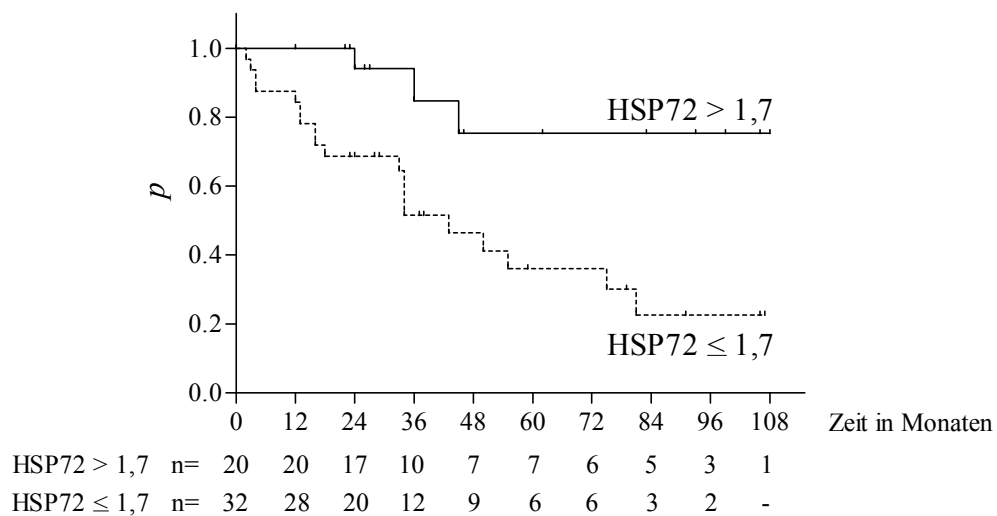


Abb. 34) Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der HSP72-Expression mit Angabe der Patienten „at risk“. Das mediane Überleben für die Gruppe HSP72 > 1,7 wurde nicht erreicht. Es lag in der Gruppe HSP72 ≤ 1,7 bei 43 Monaten, ( $p=0,0040$ , Log-Rank-Test).

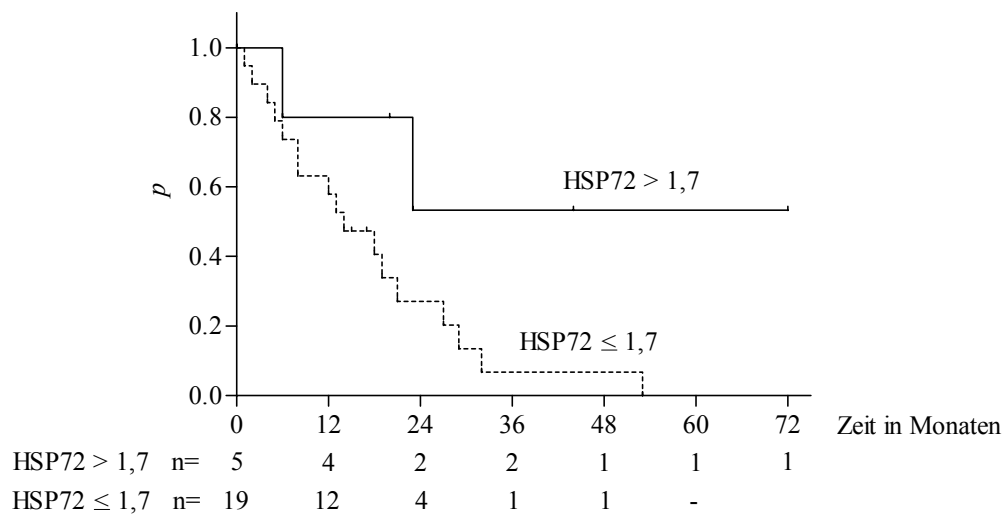


Abb. 35) Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten, die eine Chemoimmuntherapie erhalten hatten in Abhängigkeit der HSP72-Expression mit Angabe der Patienten „at risk“. Das mediane Überleben für die Gruppe HSP72 > 1,7 wurde nicht erreicht. Es lag in der Gruppe HSP72 ≤ 1,7 bei 14 Monaten ( $p=0,0454$ , Log-Rank-Test). Das Ansprechverhalten wurde in dieser Darstellung nicht berücksichtigt. Bei 3 der 5 Patienten mit einem HSP-Wert > 1,7 traten jedoch objektive Remissionen unter Chemoimmuntherapie auf.

Die Ergebnisse der multivariaten Analyse sind in Tabelle 19 dargestellt. Es zeigte sich, dass die HSP72-Expression neben der T-Kategorie und dem Grading als unabhängiger prognostischer Faktor mit dem höchsten Signifikanzniveau einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten hatte ( $p=0,019$ ). Die Metastasierung führte bei der geringen Anzahl von Patienten mit vielen zensierten Werten und der Tatsache, dass in der Gruppe der nicht-metastasierten Patienten kein Event (Todesfall) bei den Patienten auftrat, in der Cox-Regression nicht zu plausiblen Ergebnissen. Für die Metastasierung konnte die Cox-Regression daher nicht angewandt werden [70,212].

Mit einer Kreuztabelle (siehe Tab. 20) kann jedoch demonstriert werden, dass eine hochsignifikante Korrelation zwischen der HSP72-Expression und dem Metastasierungsstatus bestand ( $p=0,001$ , Mantel-Haenszel-Test). Eine geringe HSP72-Expression war hochgradig mit dem Auftreten von Metastasen assoziiert. Bei 23 von 25 Patienten mit einem HSP72-Wert unterhalb des Cut-offs traten Metastasen auf.

Tab. 19) Multivariate Analyse (\* = signifikant).

Faktor	p-Wert	relatives Risiko	95 % CI
HSP72-Expression	0,004*	6,467	1,818 – 23,009
T-Kategorie	0,031*	5,104	1,157 – 22,507
Grading	0,043*	2,766	1,032 – 7,413

Tab. 20) Kreuztabelle (HSP72-Expression und Metastasierungsstatus, p=0,001, Mantel-Haenszel-Test).

	HSP72 > 1,7	HSP72 ≤ 1,7	Summe
M0	14	2	16
M1	13	23	36
Summe	27	25	52

#### **4.2.3 Anreicherung von HSP70-Peptid-Komplexen**

Ein grundlegendes Problem bei der klinischen Anwendung von HSP70-Peptid-Komplexen als Tumorstoffimpfung besteht in der Notwendigkeit des Vorhandenseins einer ausreichenden Menge von Tumorzellen für die HSP70-Peptid-Aufreinigung. Das Tumorgewebe wird in der Regel aus dem Primärtumor oder Metastasen nach chirurgischer Extirpation bzw. aus Punktionsmaterial gewonnen. In diesem Ergebnisteil erfolgt die prinzipielle Darstellung des Anreicherungsprozesses von HSP70-Peptid-Komplexen, der potentiell für Vakzinationskonzepte aber auch für weitere Peptidanalysen und die Generierung synthetischer Vakzinen Anwendung finden kann.

Unsere Arbeitsgruppe hat sich methodisch mit der Aufreinigung von HSP70-Peptid-Komplexen befasst. HSP70 benötigt zur Bindung von Peptiden ADP als Kofaktor und besitzt eine ATPase-Aktivität [106]. Wird ATP zu ADP hydrolysiert, führt dies zur Freisetzung der an HSP70 gebundenen Peptide. Methoden zur Aufreinigung von HSP70 ohne gebundene Peptide nutzen daher die Affinität von HSP70 zu ATP; das Protein kann per ATP-Affinitätschromatographie isoliert werden [143].

Die methodische Ausnutzung der ADP-Affinitätschromatographie für die Aufreinigung von immunogenen HSP70-Peptid-Komplexen aus Tumorzellen wurde von unserer Arbeitsgruppe etwa zeitgleich mit einer anderen Arbeitsgruppe etabliert und patentiert [146,177,204,205,206].

Durch die Anreicherungsmethode besteht einerseits die Möglichkeit der effizienten und kostengünstigen Aufreinigung der Komplexe für Vakzinationszwecke, andererseits werden nach Abspaltung der an HSP70 gebundenen Peptide mit ATP diese einer weiteren Analyse zur Identifikation und Charakterisierung (z.B. Massenspektrometrie, Sequenzanalyse) zugänglich gemacht. Abbildung 36 demonstriert schematisch die einzelnen Arbeitsschritte für die Aufreinigung von HSP70-Peptid-Komplexen aus Tumorgewebe.

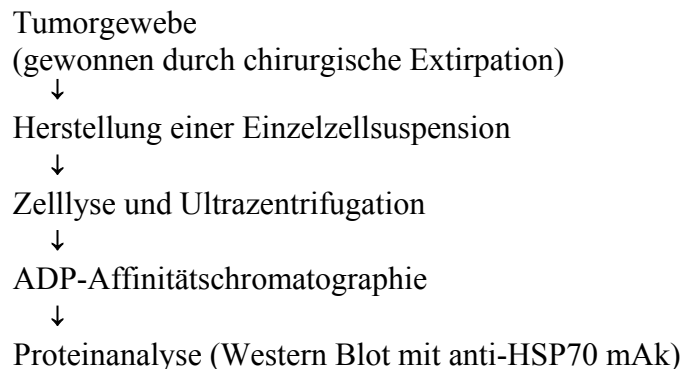


Abb. 36) Grundprinzip der Anreicherung von HSP70-Peptid-Komplexen

Die Untersuchungen zur Aufreinigung von HSP70-Peptid-Komplexen wurden an der murinen Melanomlinie B16-F1 durchgeführt. Abbildung 37 zeigt Western-Immunoblots von Eluaten der Affinitätschromatographie, die spezifisch gegen HSP70 gefärbt wurden.

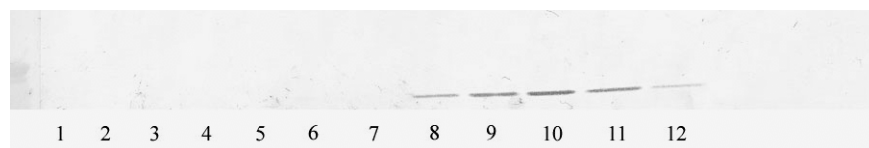


Abb. 37) Fraktionen (1 – 12, je 1 ml) der Affinitätschromatographie mit spezifischer Färbung gegen HSP70 (Antikörper N27F3-4, Stressgen Corp., Victoria, BC, Kanada, Probeneinsatz 50 µl).

Nach erfolgreichen Voruntersuchungen zur Detektion von HSP70 im Chromatographieeluat wurde die HSP70-Peptid-Vakzine mit dem gering immunogenen murinen Melanom B16-F1 in einem prophylaktischen Vakzinationsansatz getestet. Dazu wurden syngene C57BL/6 (-H2<sup>b</sup>) Mäuse zweimal wöchentlich über 4 Wochen vakziniert. Am Beginn der dritten Behandlungswoche wurden den Tieren jeweils 10<sup>5</sup> B16-F1 Zellen injiziert. Die Messung des Tumorwachstums erfolgte bis zum 22.Tag nach Tumorzellinokulation. Die in vivo Experimente

zeigten am Ende des Beobachtungszeitraumes ein signifikant verringertes Tumorwachstum bei den vakzinierten Tieren ( $0,5 \pm 0,24 \text{ cm}^2$  (n=6) versus  $3,1 \pm 0,8 \text{ cm}^2$  (n=5), ANOVA,  $p < 0,05$ ) [158].

In weiteren Schritten wurden aus der humanen NZK-Linie ACHN und primärem Nierenkarzinomgewebe von Patienten HSP70-Peptid-Komplexe entsprechend des Protokolls aufgearbeitet. Abbildung 38 zeigt die Fraktionen des ADP-Affinitätschromatographieeluats exemplarisch für die Zelllinie ACHN und eine repräsentative NZK-Probe. Es ergab sich eine Anreicherung von ca. 100 bis 250  $\mu\text{g}$  Protein pro g Feuchtgewicht der Tumorzellen bzw. des Tumorgewebes.

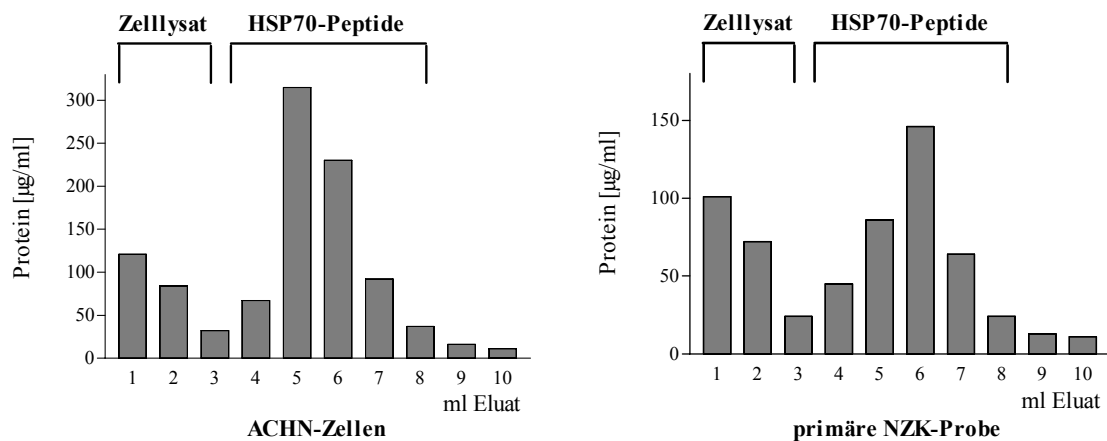


Abb. 38) Eluate der ADP-Affinitätschromatographie.

Von den im Eluat der ADP-Affinitätschromatographie enthaltenen HSP70-Peptid-Komplexen können durch die Behandlung mit ATP und anschließender Ultrafiltration ( $< 3 \text{ kDa}$ ) die Peptide abgetrennt, nachgewiesen und für weitere Untersuchungszwecke und Analysen zu Verfügung gestellt werden. In Abbildung 39 ist das HPLC-Spektrum bereits in Abbildung 38 aufgeführten Nierenkarzinomprobe nach der Abtrennung der Peptide von HSP70 mit ATP dargestellt.



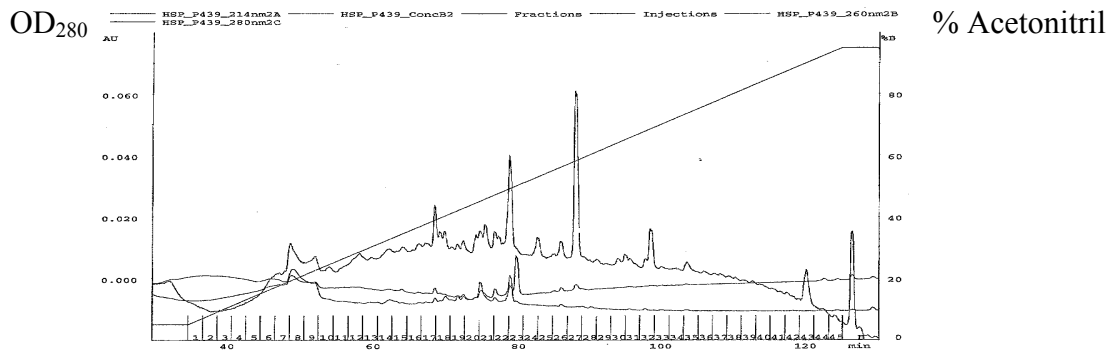


Abb. 39) HPLC der an HSP70-gebundenen Peptide einer Nierenkarzinomprobe nach ADP-Affinitätschromatographie, ATP-Inkubation und < 3 kDa Ultrafiltration. Das breit verschmierte UV-Profil weist auf eine hohe Komplexität der HSP70 assoziierten Peptide hin. Die Bereitstellung der Abbildung erfolgte freundlicherweise durch Herrn R. Demine und Herrn Prof. Dr. P. Walden, Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Charité.

Die Strukturaufklärung der in den einzelnen Fraktionen der HPLC gewonnenen Peptide kann per Massenspektrometrie und Sequenzanalyse hinsichtlich der Masse und Aminosäuresequenz erfolgen. Die immunologische Relevanz einzelner, entschlüsselter Peptide kann über die intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Freisetzung in vitro stimulierter T-Lymphozyten beurteilt werden.

Dieser methodische Ansatz erlaubt prinzipiell, identifizierte und biologisch aktive Peptide synthetisch herzustellen, erneut hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit zu prüfen und dann potentiell für Peptid- oder Protein-Peptid-Vakzinen einzusetzen.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Klinischer Teil**

In dieser Arbeit wurden die Daten von 107 nicht-selektionierten Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen analysiert, die im Zeitraum von April 1993 bis Dezember 2001 an unserer Klinik mit einer Chemoimmuntherapie auf der Basis von subkutan appliziertem IL-2 und IFN- $\alpha$ 2a sowie intravenös appliziertem 5-FU behandelt worden waren.

Bei 103 auswertbaren Patienten wurde eine Rate objektiver Remissionen von 22,1 % mit einer medianen Dauer von 13 Monaten, einem medianen Überleben von 19 Monaten und einer kalkulierten 5-Jahres-Überlebensrate von 17 % erzielt. Des Weiteren lagen Stabilisierungen bei einem Anteil von 46,2 % mit einer medianen Dauer von 8 Monaten vor. Damit konnte bei knapp 70 % der Patienten die progrediente Tumorerkrankung zumindest zeitweise gestoppt werden.

Die Kombination der Zytokine erfolgte auf der Basis klinischer Daten der letzten 15 bis 20 Jahre, die für IL-2 und IFN- $\alpha$ 2a die beste Wirksamkeit als Einzelsubstanz bei der Behandlung des metastasierten NZK gezeigt haben [14,34,214]. Die zusätzliche Gabe von 5-FU wird in der Literatur kontrovers diskutiert, die Zusammenfassung bisheriger klinischer Daten deutet jedoch auf eine weitere Effektuierung durch die Dreifachkombination in Bezug auf das primäre Ansprechen auf eine Immuntherapie hin [14,34].

Die retrospektiv beobachteten objektiven Remissionen sind vergleichbar mit den Ergebnissen von Dutcher und Samland [45,164]. Dutcher erzielte bei 50 Patienten mit der Dreifachtherapie eine Rate objektiver Remissionen von 18 % mit einer medianen Dauer von 8 Monaten und einer medianen Überlebenszeit von 17,5 Monaten bei gleichen Therapieschemata jedoch unter Anwendung von IFN- $\alpha$ 2b [45]. Bei Samland et al. lag die Rate von Remissionen in einer retrospektiven Analyse von 37 Patienten bei 19,1 % [164]. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten waren nahezu identisch mit 70 % nach einem Jahr und 30 %, gegenüber 37 % in unserer Analyse, nach 3 Jahren. In einer weiteren Studie von Allan et al. wurde 5-FU in einer Dosierung von 200 mg/m<sup>2</sup> als kontinuierliche venöse Infusion appliziert [2]. Die Dosen von IL-2 und IFN- $\alpha$ 2a wurden bezogen auf das von Atzpodien et al. publizierte klassische Dreifachschemata, nicht verändert. In dieser Studie mit 42 Patienten wurde eine objektive Ansprechrate von 40 % mit einem medianen Überleben von 18 Monaten erreicht [2].

Unsere Therapieergebnisse sind im Vergleich nicht so hoch wie die publizierten Daten anderer deutscher Autoren, die über Ansprechraten von bis zu 40 % berichteten [15,80,108]. Ein wesentlicher Grund dafür kann im Patientenkollektiv begründet liegen, das in unserer Studie einen 20 %igen Anteil von Patienten mit einem Karnofsky-Index von unter 80 % aufwies. In

anderen Studien wurden beispielsweise nur Patienten mit einem Karnofsky-Index von mindestens 80 % rekrutiert [15,80]. Die Patienten ohne Ansprechen auf die Therapie hatte ein medianes Überleben von nur 7 Monaten, im Gegensatz dazu standen die Patienten mit einer Stabilisierung oder Remission der Erkrankung, die ein medianes Überleben von 27 Monaten aufwiesen. Samland et al. berichteten in ihrem Patientenkollektiv über ein 33monatiges medianes Überleben bei Patienten mit einer Stabilisierung oder Remission [164]. Berücksichtigt man nur die Patienten mit einer Stabilisierung, so lag hier das Überleben bei 23 Monaten. Damit kommt zum Ausdruck, dass auch Patienten mit einer Stabilisierung der Erkrankung potentiell von der Therapie im Sinne einer Überlebensverlängerung profitieren können. In unserer retrospektiven Analyse konnten wir beobachten, dass nur 31,7 % der Patienten primär nicht mit einer Remission oder Stabilisierung auf die Therapie ansprachen.

Die Ergebnisse der Drei- bzw. Vierfachtherapie mit IL-2, IFN- $\alpha$ 2a, 5-FU und 13-CRA werden in der Literatur kontrovers diskutiert. In den USA spielt IFN- $\alpha$ 2 kaum eine Rolle bei der Behandlung von Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen. Die Patienten werden überwiegend mit intravenös appliziertem IL-2 behandelt. Dieses Therapiekonzept wurde kürzlich als therapeutischer Standard empfohlen [56]. Ein wesentlicher Nachteil der intravenösen IL-2 Therapie ist das Auftreten einer signifikanten Anzahl von Nebenwirkungen, die teilweise eine intensivmedizinische Betreuung der Patienten notwendig machen. Es sind jedoch 5- bzw. 10-Jahres-Überlebensraten zwischen 10 bis 20 % für den intravenösen Ansatz publiziert worden [54]. Französische Arbeitsgruppen berichteten über eine geringe Effektivität der Dreifachkombination, die in prospektiven Studien getestet wurde [137,152]. Eine Multi-Center-Studie mit 131 Patienten verglich den Effekt von 5-FU auf die Kombination von IL-2 und IFN- $\alpha$ 2a. In der Gruppe der Dreifachtherapie wurden keine CR und nur 5 PR beobachtet [137]. In einer weiteren Studie von Ravaud mit 105 auswertbaren Patienten traten nur in 1,8 % der Fälle objektive Remissionen auf [152]. Aus beiden Studien wurde geschlussfolgert, dass der angewandte Behandlungsplan von IL-2, IFN- $\alpha$ 2a und 5-FU klinisch nicht effektiv sei.

Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die kumulativen Dosen der Zytokine deutlich unterhalb der im klassischen Dreifachschema angewandten Dosierungen lagen. Die IL-2-Dosis pro Zyklus lag bei 80 % der in unserer Studie angewandten Dosis (216 Mio IU IL-2 versus 270 Mio IU IL-2) und die IFN- $\alpha$ 2a Dosis betrug nur 25 % (!) der in unserem Schema eingesetzten Dosis (72 Mio IU versus 288 Mio IU). Demgegenüber erfolgte die Gabe von 5-FU nicht sequentiell in der zweiten Hälfte eines Therapiezyklus, sondern durchgängig während des gesamten Zyklus mit einer kumulativen Dosis von 6000 mg/m<sup>2</sup> und betrug damit das Doppelte

der Dosis des klassischen Schemas (3000 mg/m<sup>2</sup>). Die höheren Dosen und die kontinuierliche Gabe von 5-FU während der Therapie könnten als eine potentielle Ursache dafür gelten, dass mit diesem Behandlungsschema insgesamt schlechtere Therapieergebnisse erzielt wurden. Elias et al. berichteten über eine Remissionsrate von 11 % bei insgesamt 38 Patienten. Auch in dieser Studie war die Zytokindosierung geringer und der Behandlungsplan modifiziert [48].

Die Toxizität der Chemoimmuntherapie lag in unserer Untersuchung in einem mit aktuellen Literaturdaten vergleichbaren Bereich. Es traten bei 21 Patienten zeitweise Therapieunterbrechungen wegen persistierender WHO Grad III/IV Toxizitäten auf. Des Weiteren wurden bei 20 Patienten Dosisreduktionen vorgenommen. Insgesamt wurde die Therapie gut toleriert und konnte, bis auf Ausnahmefälle, ambulant durchgeführt werden. Dies zeigte sich auch daran, dass die mittlere Anzahl von Zyklen in unserem Patientenkollektiv bei 2,0 lag und 43 von 104 Patienten (41,3 %), unter Berücksichtigung ihres Therapieansprechens, die gesamte Behandlung mit 3 vollständigen Zyklen erhielten.

In unserer retrospektiven Auswertung wurden durch eine multivariate Analyse weiterhin Faktoren identifiziert, die mit einem kürzeren Überleben assoziiert waren. Wie aus Tabelle 10, Seite 48 hervorgeht, war insbesondere ein geringer Karnofsky-Performance-Index hochgradig mit einer schlechten Prognose assoziiert. Dies deutet auf die Bedeutung dieses Parameters auch hinsichtlich der Therapieentscheidung zur Durchführung einer Chemoimmuntherapie hin. Der Allgemeinzustand der Patienten und das Vorhandensein von Symptomen finden als prognostische Parameter breite Akzeptanz [174].

Eine weiterer Versuch zur Optimierung des Behandlungsprotokolls erfolgte durch den zusätzlichen peroralen Einsatz von 13-CRA. In vitro konnte gezeigt werden, dass 13-CRA die antiproliferativen Effekte von IFN- $\alpha$  verstärkt [79,192] und eine erste Studie wies auf einen positiven Einfluss von 13-CRA auf die Kombination mit IFN- $\alpha$ 2a hin [120]. Motzer et al. testeten in einer Phase-II-Studie an 44 Patienten die Kombination von IFN- $\alpha$ 2a und 13-CRA. Von 43 auswertbaren Patienten wiesen 13 eine objektive Remission auf, was höher war, als die Ansprechrate einer historischen Patientenserie derselben Arbeitsgruppe, die mit einer IFN- $\alpha$ 2a Monotherapie behandelt worden war [120]. Diese ermutigenden Ergebnisse konnten nachfolgend in einer prospektiven Phase-III-Studie mit 284 Patienten jedoch nicht reproduziert werden [123]. Die Ansprechraten, 6 % für die IFN- $\alpha$ 2a Monotherapie und 12 % für die Kombination, und das mediane Überleben von 15 Monaten in beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander [123]. Stadler und Mitarbeiter veröffentlichten 1998 die Ergebnisse einer weiteren Phase-II-Studie, in der IFN- $\alpha$ 2a mit IL-2 und 13-CRA kombiniert

wurde. Es wurden eine CR und 7 PR (17 %) beobachtet [178]. In einem sehr komplexen Therapieschema wurde von Atzpodien et al. in einer Phase-I/II-Studie die Dreifachtherapie von IL-2, IFN- $\alpha$ 2a und 5-FU mit Vinblastin und 13-CRA kombiniert [12]. Es wurde über eine objektive Ansprechrates von 42 % (17 % CR und 25 % PR) bei einer geringen Anzahl von 24 Patienten mit einem guten Performance-Status berichtet. Zusätzlich trat bei weiteren 54 % der Patienten eine Stabilisierung ein. Das therapeutische Konzept wurde in dieser Form jedoch nicht fortgeführt.

In unserer retrospektiven Analyse bei Patienten mit einem guten Karnofsky-Performance-Index lag die Rate objektiver Remissionen bei 34,3 % bei der Dreifachtherapie gegenüber 26,4 % für den Arm der Vierfachtherapie und unterschied sich nicht signifikant. In beiden Gruppen lag der Anteil progressiver Patienten etwa bei 23 %. Das mediane Überleben war mit 21 Monaten für beide Gruppen identisch. Damit lässt sich aus unseren Daten kein Vorteil der Vierfachkombination gegenüber dem klassischen Dreifachtherapieschema ableiten. Die zusätzliche Toxizität von 13-CRA bezog sich in überwiegendem Maße auf moderate Haut- und Schleimhautirritationen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam das auch DGCIN 1995 Protokoll, dass die Dreifachtherapie mit der Vierfachtherapie und zusätzlich mit der Kombination Interferon- $\alpha$ 2a/Vinblastin in einer prospektiven, dreiarmligen Studie an insgesamt 341 Patienten verglichen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Ansprechraten und des medianen Überlebens in beiden Therapiearmen, die IL-2 enthielten. Die IL-2-haltigen Schemata waren nicht hinsichtlich der Ansprechraten, jedoch bezüglich des medianen Gesamtüberlebens dem Kombinationsschema von IFN- $\alpha$ 2a/Vinblastin überlegen (medianes Überleben von 25+ und 27+ Monaten für die Dreifach- bzw. Vierfachkombination versus 16 Monate für IFN- $\alpha$ 2a/Vinblastin. Der IFN- $\alpha$ 2a/Vinblastin-Arm war in dieser Studie jedoch mit 63 Patienten numerisch unterrepräsentiert [17].

In einer weiteren Subgruppe von 20 Patienten mit lokalen Rezidiven bzw. retroperitonealen Lymphknotenmetastasen oder Skelettmetastasen wurde der Einfluss einer synchronen Kombination von Chemoimmuntherapie und perkutaner Bestrahlung retrospektiv in einem „First-line“- und „Second-line“-Behandlungskonzept untersucht. Patienten mit diesen Metastasenlokalisationen weisen häufig Symptome wie Schmerzen, neurologische Symptome, Kompressionssymptome oder einen Subileus auf und haben insgesamt eine schlechte Prognose. Weiterhin konnte durch verschiedene Autoren belegt werden, dass insbesondere

Skelettmetastasen, aber auch lokale Rezidive schlecht auf den systemischen Ansatz der Chemoimmuntherapie ansprechen [80,108,115,164].

Die Rationale für den synchronen Einsatz einer systemischen Immuntherapie und einer lokalen Bestrahlung ergab sich aus tierexperimentellen Daten verschiedener Autoren am murinen RENCA-Modell [36,46,138,217,218]. Zusammengefasst ergaben die Daten eine verbesserte therapeutische Effizienz der Kombinationsbehandlung, die in einer Reduktion der Anzahl von Metastasen und der Größe der Primärtumoren und einem signifikant verlängerten Überleben resultierten. Interessanterweise konstatierten die Autoren einen systemischen Effekt der lokalen Bestrahlung, der die Wirksamkeit von IL-2 oder IFN- $\alpha$  verbesserte. Es wird vermutete, dass der therapeutische Synergismus vornehmlich über folgende Veränderungen vermittelt wird:

- Verbesserung der Infiltration der Tumoren durch Lymphozyten und Makrophagen über eine Lockerung der stromalen Integrität des Gewebes
- Erhöhung der Tumorantigenität über eine Hochregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen (am Beispiel von H-2Kd)
- Reduktion des Tumorwachstums über eine verringerte Mitose- und erhöhte Apoptoserate, sowie verstärkte Nekrose.

Derzeit liegen kaum klinische Daten zum synchronen Einsatz einer perkutanen Bestrahlung und systemischen Chemoimmuntherapie beim metastasierten NZK vor. Bis dato beinhalteten die Therapiekonzepte für das klinische Management von symptomatischen ossären Metastasen die palliative Bestrahlung als Monotherapie oder das operative Vorgehen [41,44,58,63,86,172,187]. Bei der palliativen Bestrahlung steht die Schmerzlinderung eindeutig im Vordergrund und kann, zumindest zeitweise, auch bei einer großen Anzahl von Patienten erreicht werden. Fossa et al. berichteten über eine Verbesserung der Schmerzen bei 16 von insgesamt 19 behandelten Patienten (84 %). Der Zeitraum der Strahlenwirkung betrug jedoch nur 5 Monate [58]. DiBiase et al. erzielten symptombezogene palliative Therapieerfolge bei 86 von 104 Patienten mit symptomatischen ossären Metastasen mit einer medianen Dauer von 6 Monaten [41]. Die operativen Ergebnisse zur Behandlung von Skelettmetastasen des NZK sind nicht ermutigend. Verschiedene Gruppen haben ein medianes Überleben von 10 bzw. 12 Monaten bei operativ behandelten Patienten angegeben und auf den hohen Wert einer guten Patientenselektion hingewiesen [44,63]. Die operative Mortalität und Morbidität, das Ausmaß der ossären Metastasierung, der Zeitpunkt der Diagnose der ossären Metastasen (synchron oder metachron), die allgemeine Prognose des Patienten und mögliche Reduktion der Lebensqualität sollten bei der Indikationsstellung zur Operation Berücksichtigung finden.

Das klinische Management von ossären Metastasen wurde mit der Einführung der systemischen Immuntherapie erneut zur Diskussion gestellt. Es zeigte sich jedoch, dass insbesondere bei Skelettmetastasen Remissionen unter Immuntherapie schwierig zu beurteilen und nur in Einzelfällen zu erzielen waren [59,115]. Im Gegenteil, einige Autoren konnten in uni- bzw. multivariaten Analysen die Präsenz von Skelettmetastasen als Faktor identifizieren, der mit einer schlechten Prognose und kürzerem Überleben der Patienten assoziiert war [108,164].

Die klinische Rationale für den kombinierten Einsatz von Immuntherapie und Bestrahlung ergab sich folglich nicht nur vor dem Hintergrund experimenteller Daten, sondern vor allem auch aus der klinischen Notwendigkeit, das Management dieser Subgruppe von Patienten zu verbessern. In diesem Zusammenhang ist die erste klinische Arbeit zu werten, die sich mit dieser Fragestellung beschäftigt hat. Brinkmann et al. haben 12 Patienten retrospektiv untersucht, die wegen einer metastasierten Erkrankung mit einer systemischen Chemoimmuntherapie behandelt und andererseits wegen symptomatischer ossärer Metastasen bei 9 Patienten oder lokaler Rezidive bei 3 Patienten perkutan bestrahlt worden waren. Erstaunlicherweise konnten bei 4 Patienten komplette Remissionen (33 %) und bei einem weiteren Patienten eine partielle Remission (8 %) erzielt werden. Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 28 Monaten waren noch 9 der 12 Patienten (75 %) am Leben. Alle Patienten hatten eine Linderung der Schmerzbeschwerden ab 2 Wochen nach Therapiebeginn [32]. Diese Ergebnisse sind besser im Vergleich zur alleinigen Chemoimmuntherapie und deuten, ähnlich wie experimentell am murinen Modelltumor demonstriert, auf einen synergistischen Effekt beider Behandlungsformen hin.

Die Rate objektiver Remissionen in unserer retrospektiven Serie der „first-line“-behandelten Patienten betrug 27 %, eine Stabilisierung der progredienten Erkrankung konnte bei 46 % erzielt werden. Damit konnte bei über 70 % der Patienten der progrediente Erkrankungsverlauf zumindest zeitweise gestoppt werden. Die Rate objektiver Remissionen ist in unserer Serie etwas geringer als im Patientenkollektiv der o.g. Untersuchung. Als Ursache kann einerseits angesehen werden, dass unsere Gruppe 3 Patienten beinhaltete, bei denen ein sarkomatoides NZK diagnostiziert wurde. Die sarkomatoid, entdifferenzierte Form des NZK ist bekanntermaßen mit einer schlechten Prognose verbunden. Andererseits lag die kumulative Bestrahlungsdosis bei Brinkmann et al. in einem Bereich von 40 bis 50 Gy und damit etwas höher als bei unseren Patienten mit 30 bis 40 Gy [32].

Bei den 9 Patienten, die im Sinne eines „Second line“-Konzeptes behandelt worden waren, konnte keine objektive Remission beobachtet werden. Es wurde jedoch bei 5 Patienten der progrediente Verlauf der Erkrankung für einen medianen Zeitraum von 8 Monaten gestoppt. Bei

den 4 Patienten im Progress konnte kein direkter Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf die „First-line“-Chemoimmuntherapie und dem Versagen der Kombinationstherapie nachgewiesen werden. 2 der 4 Patienten waren jedoch schon nach der „first-line“-Therapie im Progress. DiBiase und Mitarbeiter konnten kürzlich für Patienten mit symptomatischen Knochenmetastasen zeigen, dass objektive Remissionen einer dosiseskalierenden Strahlentherapie signifikant von einem guten KPI ( $\geq 70\%$ ) und der Anwendung höherer biologisch effektiver Dosen von über 50 Gy abhängig waren [41]. Die 9 Patienten in unserer zweiten Subgruppe waren alle massiv vorbehandelt. 4 dieser Patienten wiesen einen KPI von  $< 70\%$  auf und die Strahlendosen lagen hier in einem Bereich von 30 bis 40 Gy. Dies kann zumindest partiell die Erklärung dafür bieten, dass keine objektiven Remissionen beobachtet wurden.

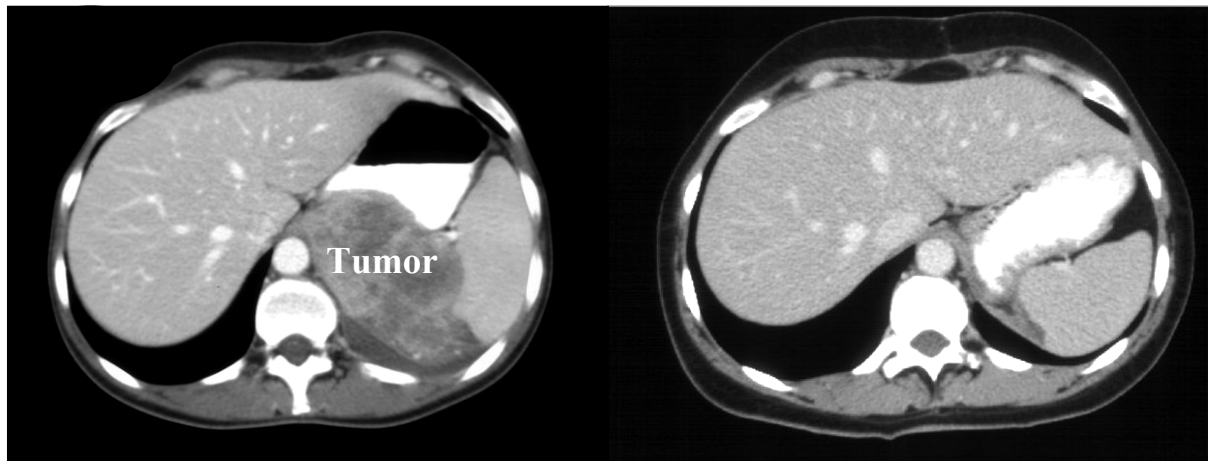


Abb. 40) CT-Aufnahme einer 35jährigen Patientin mit einem metastasierten NZK, pT3a G3 pN2 M0, Zustand nach R2-Operation und nachfolgend progredienten retroperitonealen Lymphknotenmetastasen mit Schmerzen und drohendem Ileus. Die Patientin wurde mit 3 Zyklen Chemoimmuntherapie und synchroner perkutaner Bestrahlung im ersten Zyklus behandelt. Es wurde eine CR erzielt. Die CT-Aufnahmen zeigen den retroperitonealen Befund vor (linkes Bild) und nach (rechtes Bild) kombinierter Therapie. Die Patientin ist auch 47 Monate nach Therapiebeginn in der CR.

Abbildung 40 zeigt CT-Aufnahmen einer 35jährigen Patientin, die wegen monströser retroperitonealer Lymphknotenmetastasen mit der Kombination von Chemoimmuntherapie und Bestrahlung behandelt wurde.

Insgesamt wurde die Therapie bei den 20 Patienten gut und mit den für die Chemoimmuntherapie üblichen Nebenwirkungen toleriert. Bei 2 Patienten aus der „First-line“-Therapiegruppe musste die Therapie abgebrochen werden. Bei einem Patienten trat eine schwere



Autoimmun-Thrombozytopenie am Beginn des zweiten Zyklus auf. Bei einem weiteren Patienten wurde die Therapie wegen einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes abgebrochen.

Bei 2 Patienten wurden strahlenbedingte Nebenwirkungen beobachtet. Diese Patienten entwickelten nach Bestrahlung mediastinaler Lymphknotenmetastasen jeweils eine moderate Ösophagitis.

Unsere Daten deuten, im Zusammenhang mit den Ergebnissen von Brinkmann et al., auf einen möglichen synergistischen Effekt der Kombination von perkutaner Strahlentherapie und systemischer Chemoimmuntherapie bei Patienten mit ossären Metastasen, Lymphknotenmetastasen oder lokalen Rezidiven hin. Unsere Beobachtungen untermauern das aggressive therapeutische Konzept bei tolerabler Toxizität und weisen auf die Notwendigkeit der Durchführung weiterer klinischer Studien zur prospektiven Prüfung dieses Behandlungskonzeptes hin.

An unserer Klinik wurden zwischen 1992 und 2000 24 Patienten mit NZK und einem Vena-cava-Zapfen im Stadium III und IV operiert und nachbetreut und retrospektiv hinsichtlich der perioperativen Ergebnisse, des Einflusses des Tumorthrombus auf das Überleben und der Ergebnisse der im metastasierten Stadium durchgeführten Immuntherapie untersucht.

Unsere perioperative Morbiditätsrate lag mit 31 % bei Patienten im Stadium III und 73 % bei Patienten im Stadium IV im Bereich von in der Literatur angegebenen Daten, wobei sich eine deutliche Zunahme schwerer Komplikationen bei atrialer Tumorthrombus-Ausdehnung nachweisen ließ [167,180]. Ähnliche Ergebnisse beobachteten Staehler et al. mit 37 % Komplikationen im Stadium III und 76 % im Stadium IV (inklusive Mortalität bei 50 %) [180]. Gschwend berichtete über eine vergleichbar hohe peri- und postoperative Komplikationsrate bei Patienten mit Vena-renal- oder Vena-cava-Befall, wobei in dieser Analyse nur ein Patient mit atrialer Vena-cava-Ausdehnung operiert worden war [65].

Die intra- und postoperative Mortalität wird mit etwa 9 % bis 50 % speziell für Patienten im Stadium IV der Vena-cava-Invasion angegeben [92,180,181]. In unserer Serie lag die Mortalität mit 9 % im Stadium IV (ein Patient von 11) im unteren Bereich der in der Literatur angegebenen Daten.

Multivariate Analysen zur Identifikation prognostischer Faktoren, insbesondere der Rolle der Ausdehnung der Tumorzapfen sind in einer Reihe von Studien durchgeführt worden [50,135,180,196]. Danach scheint die kraniale Ausdehnung des Vena-cava-Thrombus keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten zu haben. Dies konnten wir auch in unserer Analyse

durch den Vergleich mit einer Kontrollgruppe ohne Vena-cava-Zapfen bestätigen. Beide Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich des Überlebens (siehe Abb.8, Seite 56). In Übereinstimmung mit den Befunden von Staehler, erwies sich jedoch der Metastasierungsstatus als signifikanter Prognosefaktor [181]. Im Gegensatz zu Literaturbefunden war in unserem Patientengut der Lymphknotenstatus ohne Einfluss auf das Überleben der Patienten. Als Ursache dafür kann die Tatsache angesehen werden, dass lediglich drei Patienten Lymphknotenmetastasen aufwiesen und nur ein Patient in das Stadium pN2 klassifiziert wurde.

Während noch vor wenigen Jahren das Vorhandensein von Fernmetastasen als relative Kontraindikation zur Durchführung einer Operation insbesondere bei Patienten mit Vena-cava-Zapfen im Stadium IV galt, wird heute eine Erweiterung der OP-Indikation auch bei diesen Patienten diskutiert. Die Rationale für dieses therapeutisch-aggressive Vorgehen ergibt sich aus verbesserten Operationstechniken unter Anwendung orthotoper Lebertransplantationstechniken mit „Mercedes“-Inzision, Pringle Manöver (Abklemmen des Ligamentum hepatoduodenale) und extremer Lebermobilisierung, die den langstreckigen anterolateralen Zugang zur Vena cava erleichtern [37,167]. Andererseits bietet die Einbeziehung der Immuntherapie in das gesamte Behandlungskonzept eine sinnvolle therapeutische Option für Patienten mit Fernmetastasen. Staehler und Brkovic haben in ihrer 11jährigen Serie von 66 operierten Patienten mit Vena-cava-Zapfen 16 Patienten mit Fernmetastasen operiert, die ein medianes Überleben von 10,5 Monaten mit einer Ein- bzw. Zwei-Jahres-Überlebensrate von 46 und 17 % aufwiesen [180]. In der Studie von Naitoh dagegen wurden 31 Patienten mit NZK mit Vena-cava-Befall und synchroner Metastasierung retrospektiv untersucht [135]. Von den 31 Patienten konnten 25 (80 %) einer nachfolgenden Immuntherapie zugeführt werden, bei einem weiteren Patienten war zum Zeitpunkt der Publikation die Therapie noch nicht begonnen worden. Nur bei 5 Patienten war die Durchführung einer Immuntherapie aufgrund eines raschen Progresses der Tumorerkrankung nicht möglich. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug für alle Patienten 17 %. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem Überleben und der Durchführung einer Immuntherapie ( $p=0,042$ ), während sich die Präsenz von Lungenmetastasen ( $p=0,058$ ) und ein niedriges Grading ( $p=0,077$ ) als marginal-signifikante Prognosefaktoren erwiesen, die in einer multivariaten Analyse mit einem verlängerten Überleben assoziiert waren.

Unsere Ergebnisse legen im Zusammenhang mit aktuellen Literaturdaten ein aggressives Therapiekonzept bei Patienten mit NZK und Vena-cava-Zapfen im Stadium III und IV nach Staehler unter Kombination von Operation und nachfolgender Immuntherapie bei dem Auftreten von Metastasen nahe. Dieses Vorgehen lässt sich aus der Tatsache ableiten, dass die kraniale Ausdehnung der venösen Tumorzapfen per se keine prognostische Relevanz besitzt. Mit der

Entwicklung verbesserter Operationstechniken einerseits und den zunehmenden Erfahrungen mit der systemischen Immuntherapie im metastasierten Stadium andererseits wurden jedoch Voraussetzungen geschaffen, die zu akzeptablen Langzeit-Überlebensraten der Patienten führen. Die Therapieentscheidung sollte dennoch in jedem einzelnen Fall individuell getroffen werden und sich am Allgemeinzustand, dem Vorhandensein von Komorbiditäten und dem Ausmaß der Metastasierung orientieren.

In den Untersuchungen wurde zusätzlich der Wert der tumorspezifischen Form der M2-Pyruvatkinase (TU M2-PK) als biologischer Marker evaluiert. In einer ersten Serie erfolgte zunächst die Analyse bei verschiedenen urologischen Tumoren. Es konnten signifikant erhöhte Konzentrationen beim nicht-metastasierten und metastasierten NZK, jedoch nicht beim Urothelkarzinom, beim Prostatakarzinom oder bei der benignen Prostatahyperplasie nachgewiesen werden. Für das Nierenzellkarzinom steht derzeit kein klinisch brauchbarer biologischer Marker zur Verfügung, der die Erstdiagnose und Verlaufskontrolle bei dieser Erkrankung vereinfacht. Durch die zunehmende Diagnostik kleinerer maligner renaler Raumforderungen und dem damit verbundenen höheren Anteil an organerhaltenden Operationsmethoden („nephron-sparing-surgery“), gewinnt die lokale Tumorkontrolle zunehmend an Bedeutung. Die Strategie des Organerhalts setzt jedoch eine regelmäßige bildgebende Nachbeobachtung der Patienten oder die Anwendung eines gleichwertigen und verlässlichen biologischen Markers voraus. In ca. 20 bis 30 % der Patienten treten bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Fern- oder Lymphknotenmetastasen auf, die oft zu einer nachfolgenden immunmodulatorischen Behandlung der Patienten nach Tumornephrektomie führen. Sowohl für die Nachbeobachtung von Risikopatienten, als auch während der Therapie der metastasierten Erkrankung wäre die Anwendung eines biologischen Markers hilfreich.

Die tumorspezifische Form der Pyruvatkinase konnte immunhistochemisch beim Nierenkarzinom nachgewiesen werden [53,208]. Neuere Studien belegen auch den Nachweis des Proteins im peripheren Blut von Patienten mit einem NZK [142,159,201,207]. Auch in unserer Studie war die TU M2-PK im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht, die Unterschiede im Plasma der Patienten waren am Deutlichsten beim metastasierten NZK. Dies kann als Ausdruck der erhöhten Tumorlast im fortgeschrittenen Stadium und der damit verbundenen erhöhten Freisetzung des Enzyms in das Plasma gewertet werden. Oremek et al. erzielten in einer Studie ähnliche Ergebnisse, als das Robson Stadium, das indirekt auch die Tumormasse repräsentiert, mit dem Biomarker korreliert wurde. Patienten mit einem hohen Robson-Stadium (lokal fortgeschrittene oder metastasierte Erkrankung) wiesen signifikant

höhere TU M2-PK-Werte auf [142]. Wechsel et al. beobachteten einen signifikanten Zusammenhang mit dem Robson-Stadium, aber auch mit dem zellulären Grading und dem Metastasierungsstatus. In dieser Studie betrug die Sensitivität der TU M2-PK für lokalisierte NZK 60 % und stieg bei Tumoren im Stadium Robson III und IV auf 71, bzw. 100 % an [207]. Im Gegensatz dazu betrug die in unserer ersten Serie gemessene Sensitivität auf der Basis der 95%igen oberen Referenzgrenze nur 27,5 % für nicht-metastasierte, und 66,7 % für metastasierte Nierenkarzinome. Diese Unterschiede können, zumindest partiell damit begründet werden, dass in unserer Studie Heparinplasma verwendet wurde. Von Hugo et al. konnte kürzlich gezeigt werden, dass Lymphozyten geringe Mengen der TU M2-PK in Serum und Heparinplasma freisetzen können, nicht jedoch in EDTA-Plasmaproben [81].

Unsere Daten verdeutlichen, dass die TU M2-PK als unspezifischer metabolischer Marker maligner Zellen nicht für die Frühdiagnose maligner renaler Raumforderungen geeignet scheint. Eine potentielle Bedeutung des Biomarkers lässt sich für die Verlaufskontrolle bei Patienten mit metastasierten Nierenkarzinomen ableiten. Die Bedeutung der TU M2-PK beim fortgeschrittenen NZK wurde in einer zweiten Serie untersucht.

In der ersten Serie wurde die TU M2-PK auch bei Patienten mit Prostatakarzinomen, Urothelkarzinomen und der benignen Prostatahyperplasie analysiert. Die Untersuchungen zu Prostatakarzinom und BPH erfolgten zur Fragestellung der Optimierung der Diskrimination zwischen beiden Erkrankungen, um damit ggf. zur Verbesserung der diagnostischen Wertigkeit von TU M2-PK und PSA im Vergleich zum alleinigen PSA beizutragen. Im Gegensatz zu Mazurek et al., die bei 17 Patienten mit einem Prostatakarzinom signifikante Erhöhungen im Vergleich zu 28 Kontrollpersonen feststellten, konnten wir in unserem Untersuchungsgut (57 Kontrollpersonen und 58 Patienten mit Prostatakarzinom) keine signifikanten Unterschiede nachweisen [112]. Aus der Studie von Mazurek liegen keine Angaben hinsichtlich des Stadiums der Erkrankung bei den PCA-Patienten vor. Unsere Ergebnisse belegen jedoch, dass auch bei den metastasierten Patienten keine signifikanten Enzymerhöhungen im Plasma zu verzeichnen waren.

Die Bestimmung der TU M2-PK ist nach unseren Erkenntnissen nicht geeignet zur Diagnose des Prostatakarzinoms oder Urothelkarzinoms und dient ebenfalls nicht zur Differenzierung zwischen Prostatakarzinom und BPH [159].

In der zweiten Untersuchungsreihe wurde die Bedeutung der TU M2-PK als biologischer Marker bei metastasierten Nierenzellkarzinom untersucht. Hier wurden bei 68 Patienten die Werte des Markers nach Tumornephrektomie und vor der Behandlung der Metastasen analysiert. Vom

onkologischen Standpunkt wäre in dieser Situation ein Tumormarker, der einerseits die aktuelle Präsenz der vorhandenen Metastasen, aber andererseits auch das Ansprechen auf eine Behandlung reflektieren würde, von hoher klinischer Bedeutung.

In der Literatur existieren derzeit keine Untersuchungen hinsichtlich des TU M2-PK-Verlaufes bei Patienten mit einem metastasierten NZK unter Therapie. In der Gruppe von 68 Patienten war die TU M2-PK nach Operation des Primärtumors in 48 Fällen oberhalb des Cut-offs von 15 kU/l erhöht (siehe Abb. 11, Seite 60). Gering differenzierte Karzinome wiesen signifikant höhere Werte auf als mäßig differenzierte NZK (Abb. 12, Seite 60). Hinsichtlich des histologischen Subtyps, der Tumormasse, der Anzahl der betroffenen Organsysteme, des Geschlechts und des Zeitpunktes des Auftretens der Metastasen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die genannten Ergebnisse hinsichtlich des Gradings und des histologischen Subtyps stehen in Übereinstimmung mit den Befunden von Wechsel et al. an 40 NZK-Patienten [207].

Es existieren nur wenige Berichte bezüglich der Bedeutung der TU M2-PK als Verlaufparameter bei Patienten mit metastasierten Krebserkrankungen unter Therapie. Eine positive Korrelation zwischen dem Tumormarkerverlauf und der klinischen Situation wurde in kasuistischer Form beim Bronchialkarzinom und bei 5 unbehandelten Patienten mit metastasierten Nierenkarzinomen beschrieben [109,207]. Lüftner et al. haben den TU M2-PK-Verlauf bei 34 Patienten mit fortgeschrittenen Mammakarzinomen unter Chemotherapie untersucht. Bei 12 der 14 Patienten mit einer Tumorprogression wurden ansteigende TU M2-PK-Werte ermittelt. Bei 20 weiteren Patienten mit einem stabilen Erkrankungsverlauf oder einer Remission waren die Werte entweder initial negativ oder fielen nach dem ersten Zyklus Chemotherapie auf Werte unterhalb des Cut-offs von 15 kU/l [109]. In einer Studie von Klapdor et al. wurde die TU M2-PK bei 22 Patienten mit Pankreaskarzinomen und 4 weiteren Patienten mit kolorektalen bzw. Magenkarzinomen untersucht und mit den CA19-9-Werten verglichen [97]. Nur 7 der 22 Patienten (32 %) wiesen initial erhöhte TU M2-PK-Werte (oberhalb 15 kU/l) auf. Bei 14 Patienten, darunter 3 Patienten mit einer CR und 6 Patienten mit einer Progression, waren die Werte normal. In Übereinstimmung mit diesen Befunden war bei 3 von 4 der eigenen Patienten (75 %) mit einer CR und gleichzeitiger geringer pulmonaler Tumorlast die TU M2-PK initial negativ. Dagegen hatten nur 25, 35 bzw. 45 % der Patienten mit einer Partiellen Remission, Stabilisierung oder Progression initial negative Werte. In unserer Untersuchung stimmte der Verlauf der TU M2-PK mit dem bildgebend ermittelten Ansprechen auf die Chemoimmuntherapie bei 34 von 50 Patienten überein (positiver prädiktiver Wert 0,68 %). Wenn jedoch die Verläufe für die gesamten Patienten pro Gruppe analysiert wurden, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 13, Seite 62). Es wird vermutet, dass dies

Ausdruck der individuellen Variabilität der TU M2-PK ist, die zu einem hohen Anteil durch den Differenzierungsgrad und die Tumormasse bestimmt wird. Die Sensitivität des Markers war bei unbehandelten Patienten oder bei Patienten mit einem erneute Progress nach Chemoimmuntherapie am höchsten (94 bzw. 100 %). Eine hohe Tumormasse assoziiert mit einem geringen Allgemeinzustand und einer schlechten Prognose war für diese Patienten charakteristisch. Dies lässt darauf schließen, dass die TU M2-PK erst in einem sehr späten Erkrankungsstadium eine ausreichend hohe Sensitivität erlangt, um sie als verlässlichen biologischen Marker klinisch einsetzen zu können. Daher kann derzeit die klinische Routineanwendung der TU M2-PK als Tumormarker beim metastasierten Nierenzellkarzinom nicht empfohlen werden.

## **5.2 Experimenteller Teil**

### **HSP72-Expression auf der Oberfläche von Tumorzellen**

In unseren Untersuchungen konnte die stressinduzierte Oberflächenexpression vom induzierbaren HSP72 an der Nierenkarzinomlinie ACHN, nicht jedoch an der Prostatakarzinomlinie PC-3 nachgewiesen werden. Die Expression von HSP72 war mit einer erhöhten Lyse durch IL-2 stimulierte NK-Zellen assoziiert. Der ungewöhnliche Nachweis des normalerweise im Zytosol lokalisierten HSP72 auf der Oberfläche von Tumorzellen wurde von Ferrarini beobachtet [49]. Die Arbeitsgruppe um Multhoff und Issels hat dieses Phänomen eingehend untersucht und postuliert, dass die Expression von HSP72 auf der Zelloberfläche nach nicht-letaler Hyperthermieexposition nur für maligne Zellen zutrifft [125].

Anhand von klonogenen Überlebensstudien an Ewing-Sarkomzellen konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Hyperthermieexposition von 41,8 °C bis zu 450 Minuten Dauer keinen Einfluss auf das Überleben der Sarkomzellen hatte [125]. Unsere eigenen Untersuchungsbefunde zur LDH-Freisetzung aus ACHN-Zellen nach Hyperthermieexposition bestätigten diese Beobachtung (Daten nicht gezeigt). In weiteren Untersuchungen wurde die zeitliche Dynamik der HSP72-Expression nach Hyperthermieexposition untersucht. Es zeigte sich, ähnlich wie in den Untersuchungen von Multhoff et al., eine bis zu 48 Stunden anhaltende Expression mit einem Maximum zwischen 8 bis 24 Stunden (Abbildung 17, Seite 66) [125]. Dieselbe Arbeitsgruppe hat die stressinduzierte Expression von HSP72 an verschiedenen Tumorzellen untersucht. Danach wiesen verschiedene Sarkomzellen und eine Larynxkarzinomlinie eine deutliche HSP72-Membranexpression auf. Das Phänomen konnte an Lymphomzellen, einer

Mammakarzinomlinie und benignen Zellen (B-Zellen, peripheren Blutlymphozyten und Fibroblasten) nicht nachgewiesen werden [27,125].

Der Zusammenhang zwischen der stressinduzierten HSP72 Membranexpression maligner Zellen und ihrer erhöhten in vitro Lyse durch IL-2 stimulierte NK-Zellen war eine zentrale Erkenntnis der experimentellen Arbeiten von Multhoff et al. [27,126]. Diese erhöhte Lyse war nicht auf eine Verringerung der Expression von MHC-Molekülen zurückzuführen [126]. Auch mit unseren Daten konnte die Beobachtung einer erhöhten Lyse HSP72-positiver Zellen bestätigt werden. HSP72-positive, hyperthermierte ACHN-Zellen wiesen eine signifikant erhöhte Lyse auf im Vergleich zu HSP72-negativen, hyperthermierten PC-3-Zellen. Die erhöhte Lyse war durch anti-HSP72-Antikörper inhibierbar [156]. Die Literaturdaten bezüglich der Hyperthermie-induzierten Lyse durch NK-Zellen sind nicht einheitlich. Kubista et al. beobachteten eine erhöhte in vitro Lyse von Chondro- und Osteosarkomzellen nach Hyperthermieexposition von 42,5 °C für 90 Minuten [100]. In dieser Studie wurde jedoch nicht die Membranexpression von HSP72 untersucht, sondern die zytoplasmatische HSP72-Akkumulation nach Hyperthermie per Western-Immunoblotting analysiert. Die NK-Effektorzellen wurden in dieser Studie nicht mit IL-2 präinkubiert (im Sinne von lymphokinaktivierten Killerzellen), sondern nativ für die in vitro Lyseexperimente eingesetzt.

Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen von Vendetti et al. und Blom et al. [24,202]. An humanen Pankreaskarzinomzellen (HPC-4) führte eine Hyperthermieexposition zwar ebenfalls zu einer Membranexpression von HSP72. Die Zellen waren jedoch, unabhängig vom Hyperthermieeinfluss, resistent gegenüber der Lyse durch NK-Zellen. Die Lyse durch LAK-Zellen war nach Hyperthermieexposition in dieser Studie signifikant verringert [202]. Auch an uveal Melanomzellen ließ sich nach Hyperthermieexposition keine erhöhte Sensibilität gegenüber einer NK-Lyse nachweisen [24].

Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch die basale Expression von HSP72 auf Tumorzellen eine Bedeutung für die Lyse durch IL-2-stimulierte NK-Zellen haben kann. Botzler et al. verglichen humane Lungenkarzinomzellen (LX-1) und Mammakarzinomzellen (MX-1) bezüglich ihrer basalen HSP72-Expression. Obwohl sich die Präsentation von MHC-Molekülen beider Zelllinien nicht unterschied, wiesen LX-1 Zellen eine 90 %ige und MX-1-Zellen eine unter 5 %ige HSP72-Expression auf. Die Expression von HSP72 ließ sich mit der Lyse durch NK-Zellen korrelieren. Nach Blockierung von HSP72 mit Antikörpern ging die Lyse bei den HSP72-positiven LX-1-Zellen zurück, während sie bei den MX-1-Zellen unverändert blieb [27]. Der basale Nachweis von HSP72 auf der Zelloberfläche einer Vielzahl primärer Tumorbiopsien,

u.a. an Lungenkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, Pankreaskarzinomen, Lebermetastasen und leukämischen Blasten von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, nicht jedoch an Mammakarzinomen und an benignen Zellen, weist auf den tumor-selektiven Charakter, aber auch die differenzierte Expression des Moleküls HSP72 innerhalb verschiedener Tumore hin [67]. In unseren Studien konnten wir HSP72 basal an 27 von 29 Tumorproben nachweisen, jedoch nur bei der hyperthermieinduzierten Expression bestand ein Zusammenhang mit anderen Parametern. Bei höheren T-Kategorien und bei Metastasen war die HSP72-Membranexpression signifikant verringert. Inwieweit die stressinduzierte Membranexpression eine prognostische Bedeutung hat, bleibt derzeit offen.

Aus der Beobachtung einer basalen HSP72-Membranexpression lässt sich formal ableiten, dass eine Induktion der HSP72-Membranexpression zu einer Erhöhung der klinischen Effektivität einer IL-2 basierten Zytokintherapie führen könnte. Die in vivo Expansion und Aktivierung von NK-Zellen unter subkutaner IL-2- und IFN- $\alpha$ -Therapie ist in einer Reihe von Studien als entscheidender Faktor der Immunaktivierung identifiziert worden [11,118,145]. Philipps und Lanier konnten schon sehr frühzeitig zeigen, dass die IL-2 vermittelte Generation zytotoxischer Zellen (LAK-Zellen) in vitro auf eine Aktivierung von NK-Zellen (CD3-, CD56+) zurückzuführen war, während CD3-positive T-Lymphozyten nur zu einem geringen Teil an der Herausbildung des LAK-Phänomens beteiligt waren [147]. Verschiedene Untersucher konnten neben der numerischen Expansion der NK-Zellpopulation auch eine Zunahme der Lyseaktivität und eine Korrelation mit der klinischen Response der Patienten beobachten [11,33,166]. Möglicherweise stellt auch in vivo die basale Expression von HSP72 auf Nierentumorzellen eine Zielstruktur für IL-2 stimulierte NK-Zellen dar. Daraus ergibt sich die Rationale, eine IL-2-basierte Immuntherapie mit einer anderen HSP72-induzierenden Therapieoption, z.B. einer regionalen Hyperthermie, zu kombinieren, um den Zusammenhang zwischen HSP72-Membranexpression und NK-Lyse klinisch auszunutzen.

Der Nachweis von HSP72 auf malignen Zellen und die damit verbundene erhöhte NK-Lyse wird als tumorassoziiertes Phänomen diskutiert. Auf benignen, gesunden Zellen konnte HSP72 bisher nicht nachgewiesen werden. Dazu wurden PBL, Fibroblasten aber auch Normalgewebe verschiedener Organe (ZNS, Kolon, Lunge, Endothelzellen) untersucht [67]. An renalen Zellen konnten wir hingegen eine, wenn auch geringere, basale und hyperthermieinduzierbare Expression von HSP72 nachweisen. Eine starke zytoplasmatische HSP70-Expression in Tubulusepithelzellen ist beschrieben worden [20] und wurde auch in den eigenen



immunhistochemischen Untersuchungen beobachtet (siehe Abbildung 41a). Möglicherweise besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen Expression von HSP72 und der Präsentation auf der Zelloberfläche von Tubuluszellen, die die Expression von HSP72 auf der Zelloberfläche renaler Zellen erklärt.

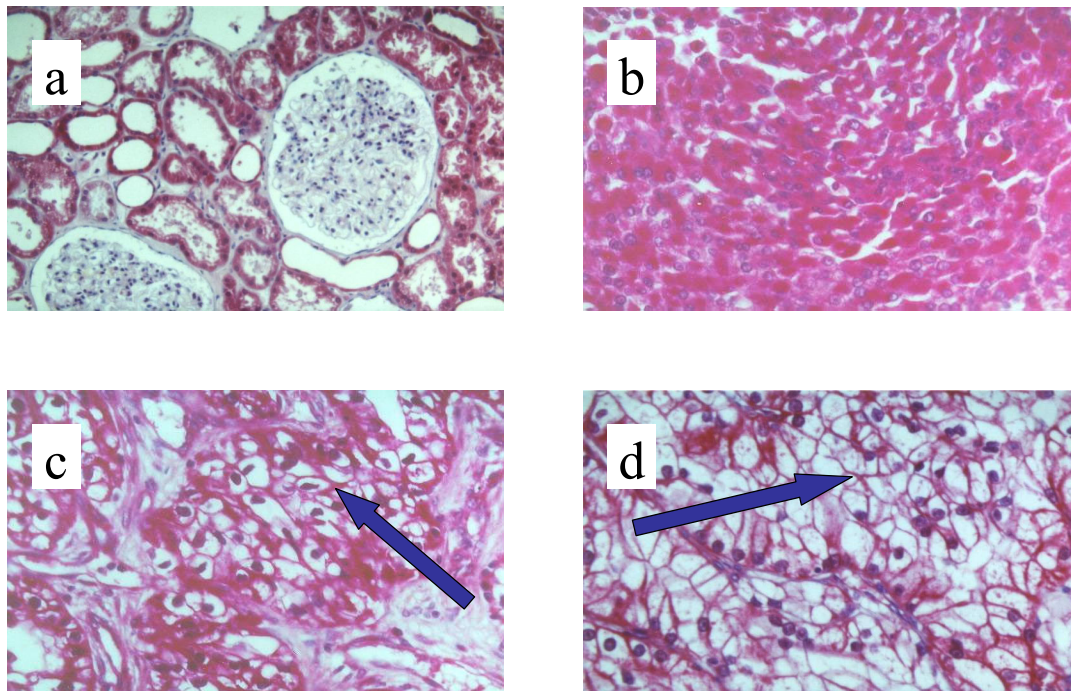


Abb. 41) Darstellung normaler, positiv anti-HSP72-gefärbter Tubulusepithelzellen (a, Vergrößerung 1:200), stark gefärbter Karzinomzellen (b, Intensitätsgrad 3, Vergrößerung 1:400) und Karzinomzellen, bei denen das Zytoplasma kaum angefärbt ist (c und d, Vergrößerung 1:400). In den benignen Tubulusepithelzellen und den Karzinomzellen von Präparat b ist das Zytoplasma positiv angefärbt. In den Karzinomzellen der Präparate c und d ist eine spezifische Anfärbung von Zellmembranen erkennbar (Pfeil).

Die Oberflächenexpression von HSP72 variiert innerhalb verschiedener Tumorentitäten, wie an Primärzellen aus Biopsiematerial gezeigt werden konnte [67]. Unsere Daten belegen, dass auch innerhalb einer Entität interindividuelle Unterschiede des Expressionsgrades nachweisbar sind. Interessanterweise ließ sich eine unterschiedliche HSP72-Expression selbst innerhalb einer Tumorzelllinie am Beispiel der Kolonkarzinomlinie CX2 nachweisen [129]. Diese Zellen unterschieden sich lediglich hinsichtlich der HSP72-Expression, nicht jedoch in Bezug auf andere Oberflächenmarker, die zur phänotypischen Charakterisierung der Zellen (MHC-Moleküle, Adhäsionsmoleküle) herangezogen wurden [129]. Nach Separation der beiden unterschiedlichen Zelltypen und Zellzyklussynchronisation konnte demonstriert werden, dass

keine zusätzliche Abhängigkeit der HSP72-Membranexpression von bestimmten Phasen des Zellzyklus bestand [129].

Obwohl die Beteiligung der HSP am Membrantransport von Proteinen zu ihren wesentlichen Funktionen zählt, konnten die Mechanismen des Transports von HSP72 auf die Zelloberfläche bisher nicht geklärt werden. Da HSP72 im Gegensatz zu anderen HSP's keine Signalsequenzen für einen transmembranen Einbau enthält, werden alternative zytosolische Transportmechanismen diskutiert [76,130,199]. Die Blockierung des Golgi-Apparates mit Brefeldin A oder Kolchizin führte nicht zu einer Hemmung der HSP72-Membranexpression, was für einen Golgi-unabhängigen Weg des Transports von HSP72 spricht [127]. HSP72 wurde bei Tumoren mit einer Oberflächenexpression des Proteins überwiegend in vesikelähnlichen Strukturen nachgewiesen. Multhoff et al. spekulierten auf der Basis dieser elektronenmikroskopischen Untersuchungen, dass HSP72 über lysosomale Strukturen auf die Zellmembran transportiert werden könnte [129].

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Nachweis von HSP72 auf normalen renalen Epithelzellen ist mit der Beobachtung einer erhöhten Lyse HSP72-positiver Tumorzellen durch IL-2-stimulierte NK-Zellen in sich nicht widersprüchlich. Jüngste Beobachtungen haben gezeigt, dass die Interaktion von HSP72 oder einem HSP72-Peptidfragment zur proliferativen und zytolytischen Aktivierung von NK-Zellen führt [131,132]. Die Langzeitinkubation mit HSP72 oder dem c-terminalen HSP72-Peptidfragment (TKD) führte zu einer Hochregulation des Rezeptors CD94 auf der Zelloberfläche und zytolytischen Aktivierung von NK-Zellen. Es wurde vermutet, dass der CD94-Rezeptor der NK-Zellen mit HSP72 interagiert [133]. Dabei zeigte sich in vitro eine Abhängigkeit der NK-Zellaktivierung von der HSP72-Konzentration. Für eine optimale Stimulation der NK-Zellen war eine Konzentration von 10 bis 50 µg/ml von freiem HSP72 bzw. 2 bis 8 µg/ml des c-terminalen Peptids TDK notwendig [133,64]. Für die in vivo Situation ist derzeit unklar, welches Ausmaß der HSP72-Membranexpression für eine NK-Zellaktivierung über CD94-Rezeptoren notwendig ist. Inwieweit die Interaktion von CD94 und HSP72 noch von zusätzlichen Korezeptoren oder Molekülen abhängig ist, wird Ziel der weiteren experimentellen Forschung sein.

### **Zytoplasmatische HSP72-Expression in Tumorzellen**

In den Studien zur zytoplasmatischen Expression an 53 Paraffinpräparaten konnten wir die HSP72-Expression als unabhängigen Prognoseparameter für Patienten mit Nierenzellkarzinomen identifizieren. Patienten mit Metastasen wiesen signifikant geringere zytoplasmatische HSP72-

Konzentrationen auf. Bei 18 von 24 Patienten im metastasierten Stadium, die mit einer Chemoimmuntherapie behandelt wurden und nicht mit einer Remission ansprachen, waren die Werte ebenfalls signifikant erniedrigt. In uni- und multivariaten Analyse war die zytoplasmatische HSP72-Expression, neben der T-Kategorie und dem Grading der unabhängige prognostische Faktor mit dem höchsten Signifikanzniveau. In der Kategorie Metastasierung trat bei der Gruppe nicht-metastasierter Patienten kein Todesfall (kein Ereignis) in der Nachbeobachtung bei einer insgesamt kleinen Stichprobe mit einer großen Anzahl zensierter Werte auf. Die multivariate Cox-Regression führt unter diesen Bedingungen bei dem zu prüfenden Faktor (Metastasierung) nicht zu plausiblen, interpretierbaren Ergebnissen. Auf dieses Problem wurde Ridout et al. 1999 und Heinze und Schemper 2001 hingewiesen [70,154]. Entsprechende Computerprogramme zur Berechnung dieser Konstellation stehen derzeit noch nicht zur Verfügung [212]. Im Mantel-Haenszel-Test konnte jedoch eine hochsignifikante Korrelation zwischen einer geringen HSP72-Expression und der Metastasierung gezeigt werden ( $p=0,001$ ).

Eine Reihe von experimentellen Untersuchungen hat sich mit der prognostischen und immunologischen Bedeutung der Expression verschiedener HSP beim Nierenzellkarzinom befasst. Santarosa et al. konnten an Einzelzellsuspensionen zeigen, dass Nierenkarzinomzellen signifikant mehr HSP72 exprimierten als Zellen, die aus gesundem Nierengewebe gewonnen worden waren. Mehr noch, eine geringe Expression von HSP72 ließ sich positiv mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben korrelieren. Patienten, die im Verlauf der Erkrankung erneut progredient wurden, wiesen signifikant geringere HSP72-Werte auf [165]. In weiteren Untersuchungen ließ sich zeigen, dass die Inkubation der Zellkulturen mit IFN- $\gamma$  zu einer signifikanten HSP72-Akkumulation führte. HSP72 konnte in dieser Untersuchung als unabhängiger prognostischer Parameter auf der Basis einer multivariaten Analyse etabliert werden [165]. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit unseren Ergebnissen und weisen auf die immunologische Bedeutung von HSP72 beim NZK hin.

Auch Bex et al. berichteten an einer kleinen immunhistochemischen Serie von 12 Nierenzellkarzinomen und 2 Metastasen, dass 3 Patienten mit einer metastasierten Erkrankung nur eine geringe HSP72-Expression aufwiesen. Ein signifikanter Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose konnte jedoch aufgrund der geringen Patientenzahl nicht hergestellt werden. Des Weiteren bestand keine Korrelation zwischen dem Tumorstadium und dem Grading des Primärtumors [20]. Eine heterogene Expression verschiedener HSP an primären Nierenkarzinomen und normalen Nierenzellen wurde auch von Lichtenfels et al. unter Anwendung Proteomics-basierter Techniken (PROTEOMEX – PROTEOMe-based target

evaluation combined with immuno-reactive target structure identification explored by sera (serEX)) beobachtet [107]. Im Gegensatz zu den Resultaten von Santarosa et al. führte eine IFN- $\gamma$ -Behandlung selbst kaum zu einer Induktion von HSP72. Hinweise auf die immunologische Bedeutung von HSP72 wurden jedoch durch den Nachweis einer spezifischen, anti-HSP-Reaktivität autologer und allogener Patientensera erbracht [107].

Der Zusammenhang zwischen Expression von HSP72 im Primärtumor bzw. in Metastasen und der Immunogenität von Tumoren ist in besonderem Maße für das NZK interessant. Unsere Untersuchungen zeigten, dass sich Primärtumoren und Metastasen nicht signifikant bezüglich der HSP72-Expression unterschieden. Die stärkere HSP72-Konzentration stellte ebenso bei immuntherapierten Patienten einen, wenn auch marginal signifikanten Überlebensvorteil dar ( $p=0,0454$ , Abbildung 35, Seite 80). Diese Beobachtung kann als ein indirekter Hinweis darauf gewertet werden, dass die intrazelluläre HSP72-Expression die Immunogenität von Nierenkarzinomen modulieren kann. Diese These wird durch Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen unterstützt. Wells et al. konnten an malignen B16 Melanomzellen zeigen, dass die stabile Transfektion mit dem HSP72-Gen zu einer Erhöhung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche und zu einer verstärkten Antigen(Peptid)-Präsentation und Erkennung durch MHC-Klasse-I restringierte CTL führte [211]. Im Gegensatz dazu beobachteten Dressel et al. in HSP70-transfektierten Melanomzellen zwar keine verstärkte MHC-Expression, jedoch war auch hier die Lyse durch allospezifische CTL erhöht, was mit einer verbesserten CTL-induzierten Apoptose begründet wurde [43]. Ähnlich demonstrierten Ito et al. an Gliomzellen, dass eine Hyperthermieexposition zu einer Verstärkung der MHC-Klasse-I-Präsentation führte, die ihr Maximum nach 24 bis 48 Stunden erreichte und mit einer erhöhten Expression von HSP70 assoziiert war. Eine erhöhte Immunogenität der hyperthermierten Gliomzellen wurde an in vivo immunisierten Milzlymphozyten im Vergleich zu nicht-hyperthermierten Gliomzellen nachgewiesen. Einen direkten Zusammenhang zwischen HSP70- und MHC-Klasse-I-Expression erbrachte diese Studie jedoch nicht [85].

Unsere Beobachtung könnte eine unmittelbare Bedeutung bei der immunhistochemischen Beurteilung von Nierenkarzinompräparaten haben. Da ein Cut-off von 1,7 im einzelnen Präparat nicht eingeschätzt werden kann, wurde die multivariate Analyse auch für einen Cut-off von 2,0 (mäßige HSP72-Expression) berechnet. Auch hier zeigte sich das höchste Signifikanzniveau für die HSP72-Expression,  $p=0,008$ ;  $\text{Exp}(B)=5,754$ ;  $1,584 < 95\% \text{ CI} < 20,897$ ). Damit wird deutlich, dass der Parameter potentiell zur prognostischen Beurteilung von Patienten mit Nierenkarzinomen herangezogen werden könnte. Durch weitere Studien müssen die bisherigen Ergebnisse jedoch an größeren Untersuchungszahlen verifiziert werden.

## HSP70-Peptid-Komplexe

Unsere Arbeitsgruppe hat sich mit der Entwicklung einer Methode zur effizienten Aufreinigung von HSP70-Peptid-Komplexen befasst. Mit der Methode der ADP-Affinitätschromatographie können aus Tumormaterial HSP70-Peptid-Komplexe angereichert und für Vakzinationszwecke aufbereitet werden. Die Effizienz gp96- oder HSP70-basierter Vakzinen konnte in einer Vielzahl tierexperimenteller Studien sowohl für den prophylaktischen, als auch für den therapeutischen Einsatz belegt werden [175,176,186,188].

In einer präliminären tierexperimentellen Untersuchung am murinen B16-F1 Melanom konnten wir die Wirksamkeit von HSP70-Peptid-Komplexen, die mit der ADP-Affinitätschromatographie angereichert worden waren, in einem prophylaktischen Ansatz an syngen C57BL/6 (-H2<sup>b</sup>) Mäusen prinzipiell bestätigen [158] und exemplarisch an der Nierenkarzinomlinie ACHN und einer primären NZK-Kultur demonstrieren, dass sich mit der Methode der ADP-Affinitätschromatographie HSP70-Peptid-Komplexe isolieren und nach Inkubation mit ATP Peptide abspalten und nachweisen lassen. Die genauere Charakterisierung spezifischer Eigenschaften der ADP-Agarosesäule wird Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Auf der Basis der bisherigen experimentellen Daten ergibt sich für die klinische Anwendung von HSP-Peptid-Vakzinen sich eine Reihe potentieller Konzepte:

1. HSP-Peptid-Vakzinen aus autologem Tumormaterial
2. Kombination von HSP-Peptid-Vakzinen mit Zytokinen, wie z.B. IL-2
3. in vitro Beladung von autologen oder allogenen DC mit HSP-assoziierten Peptiden als zelluläre Vakzine
4. in vitro Rekonstitution von HSP mit bekannten immunogenen, synthetisierten, und gepoolten Peptiden als polyvalente HSP-Peptid-Vakzine

Die klinische Anwendung von HSP-Peptid-Vakzinen wird einerseits begründet durch die Bindung tumorspezifischer, biologisch aktiver, d.h. antigener Peptide. Diese Peptide, obwohl in ihrer Struktur nicht identifiziert, sind neben einer Vielzahl irrelevanter Peptide an HSP's gekoppelt und nach Aufnahme und Repräsentation durch APC in der Lage, eine antigen-spezifische T-Zellantwort und damit potentiell eine Anti-Tumor-Reaktion auszulösen.

Obwohl HSP70-gekoppelte Peptide eine Immunantwort induzieren und als Vakzine genutzt werden können, ist die Rolle, die HSP70 bei der Prozessierung antigener Peptide im Zytosol spielt, noch nicht ausreichend aufgeklärt worden.

Neben gp96 ist auch für zytosolisches HSP70 am etablierten OVA-Antigensystem gezeigt worden, dass HSP70 der OVA-transfektierten Zelllinie EG7.OVA eine Assoziation mit dem H-2K<sup>b</sup> restringierten SIINFEKL-Epitop dieser Zellen aufwies. Nach Peptidstripping und HPLC

konnten die entsprechenden HPLC-Fractionen an identischer Position und bei identischen Acetonitrilkonzentrationen wie synthetisches SIINFEKL eluiert und RMA-Targetzellen gegenüber dem H-2K<sup>b</sup>/SIINFEKL-spezifischen T-Zellklon 4G3 sensibilisiert werden [30]. Dies bedeutet, dass neben ER-residentem gp96, auch zytosolisches HSP70 Komplexe mit antigenen, MHC-bindenden Epitopen bilden kann. Eine Beteiligung verschiedener HSP (HSP70, gp96) beim intrazellulären Peptidtransport und für die Präsentation auf MHC-Molekülen konnte auch dadurch belegt werden, dass die Applikation von HSP-Peptid-Komplexen in das Zytosol von Zellen zu einer effizienten Präsentation der antigenen Peptide auf MHC-Klasse-I-Molekülen führte. Die Präsentation war deutlich geringer, wenn freie Peptide appliziert bzw. wenn die HSP an unspezifische Substanzen gebunden wurden [22]. In diesem Modell war die Bindung antigener Peptide an HSP eine essentielle Voraussetzung für eine effiziente MHC-Präsentation.

Andererseits scheinen HSP selbst als immunologisch aktive Moleküle zu agieren. Breloer et al. konnten zeigen, dass HSP70- und gp96-Moleküle, an die keine antigenen Peptide gebunden waren, an den Ovalbumin-(OVA)- und  $\beta$ -Galaktosidase-Antigensystemen bei OVA- und  $\beta$ -gal-spezifischen T-Zellklonen die Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  als Zeichen einer T-Zell-Aktivierung auslösen konnten. Antigen-negative HSP70- und gp96-Proteine, die aus normalem Lebergewebe von Mäusen isoliert wurden, waren in der Lage, antigen-spezifisch CD8-positive T-Zellen zu stimulieren. Die T-Zell-Stimulation war nicht MHC-restringiert jedoch abhängig vom Kontakt der T-Zellen zu frisch isolierten APC (Makrophagen) [29].

Weiterhin konnte an murinen B16-Melanomzellen gezeigt werden, dass in vivo die Induktion von HSP72 mit der Generation einer potenten Immunreaktion gekoppelt war. Die Induktion von HSP70 konnte mit einer intratumoralen Infiltration von T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (DC), einer Th1 charakteristischen Zytokinfreisetzung (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-12) und einer verstärkten Antigenaufnahme durch unreife antigenpräsentierende Zellen korreliert werden [191]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass über eine Expression von HSP70 dem Immunsystem relevante Situationen signalisiert werden, die die Auslösung einer potenten Immunantwort erforderlich machen und triggern. Diese Funktion der HSP hat auch dazu geführt, die Proteine als immunologische „Danger“-Signale zu bezeichnen und legt ihre zusätzliche Bedeutung als potentiell Adjuvanz für Vakzinationskonzepte nahe [111].

Für den potentiellen klinischen Einsatz von in vitro HSP-stimulierten DC als zelluläre Vakzine sprechen eine Reihe experimenteller Befunde. Die Herausbildung einer spezifischen T-Zell-Antwort ist strikt von der Existenz funktionsfähiger APC anhängig [199] und deutet damit auf

eine entsprechende Prozessierung von HSP-Peptid-Komplexen durch APC hin. Arnold-Schild et al. konnten an den murinen Zelllinien P388D1 (Monozyten) und D2SC/1 (dendritische Zellen) elektronenmikroskopisch nachweisen, dass die mit Goldpartikeln markierten HSP gp96 und HSP70 (konstitutive Form) spezifisch an der Oberfläche der APC gebunden und spontan über eine rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert wurden. In weiteren Experimenten konnte die Kolokalisation von internalisierten HSP und MHC Klasse I Molekülen in endosomalen Strukturen nachgewiesen werden [7]. Durch Binder et al. konnte die Prozessierung HSP-gebundener Peptide durch APC weiter charakterisiert werden. An peritonealen Makrophagen (RAW264.7) konnte gezeigt werden, dass gp96 an den Oberflächenrezeptor CD91 ( $\alpha_2$ -Makroglobulinrezeptor) bindet und durch  $\alpha_2$ -Makroglobulin inhibiert werden kann [21]. Diese Beobachtung konnte auch auf andere HSP, wie HSP90 und HSP70 verschiedener Tumorzellentitäten erweitert werden [18]. Versuche mit radioaktiv-markierten Peptiden haben demonstriert, dass an der für die Bindung von gp96 mit Peptiden im ER erforderlichen Überwindung der ER-Membran der TAP-(Transporter associated with antigen Processing)-Komplex beteiligt ist [103]. Die Aufnahme HSP-gebundener exogener Antigene durch APC und deren Präsentation über ihre MHC I Moleküle (endogener Präsentationsweg) ist von kritischer Bedeutung für die nachfolgende Stimulation antigen-spezifischer T-Zell-Klone und damit der Herausbildung einer potenten Anti-Tumor-Reaktion [186].

Die zahlreichen in vitro und tierexperimentellen Ergebnisse waren Voraussetzung für die ersten klinischen Anwendungen autologer Tumor-gp96-Peptid-Präparationen, die derzeit überwiegend im Rahmen von Phase-I/II-Studien geprüft werden. Dabei kamen prophylaktische und therapeutische Indikationen an verschiedenen Tumorentitäten zum Einsatz. Die Tabellen 21 und 22 stellen eine Übersicht über ausgewählte Studien dar.

Tab. 21) Klinische Studien mit therapeutischem Konzept zur Behandlung etablierter, messbarer Metastasen (\* – keine Angabe, ob es sich um eine R0-Situation oder um etablierte Metastasen handelt; k.A. – keine Angabe).

Autor	Entität	HSP	Vakzinedesign	n	OR	SD
Janetzki et al. [87]	verschiedene	gp96	autologe gp96-Peptidvakz.	15	2 CR*	4 SD
Belli et al. [19]	Melanom	gp96	autologe gp96-Peptidvakz.	28	2 CR	3 SD
Amato et al. [4]	NZK	gp96	autologe gp96-Peptidvakz.	33	1 CR 3 PR	18 SD
Riccobon et al. [153]	Melanom	k.A.	HSP gepulste DC	7	k.A.	k.A.
Amato et al. [6]	NZK	gp96	autologe gp96-Peptidvakz. + IL-2	9	-	6 SD
Assikis et al. [8]	NZK	gp96	autologe gp96-Peptidvakz. + IL-2	61	1 CR 2 PR	18 SD
Younes et al. [216]	Non-Hod-kin-Lym.	gp96	autologe gp96-Peptidvakz.	10	1 PR	5 SD

Tab.22) Klinische Studien mit prophylaktischem Therapiekonzept nach chirurgischer Entfernung des Primärtumors oder von Metastasen (\* Metastasen kolorektaler Karzinome).

Autor	Entität	HSP	Vakzinedesign	n	NED	med. f/u
Heike et al. [69]	Magen-Ca.	gp96	autologe gp96-Peptidvakz.	10	5	9 Mo.
Mazzaferro et al. [113]	M1 hep*	gp96	autologe gp96-Peptidvakz.	29	16	12 Mo.
Lewis [105]	Pankreas-Ca.	gp96	autologe gp96-Peptidvakz.	3	k.A.	k.A.

Entsprechend ihrer Zielstellungen (Durchführbarkeit/Toxizität) konnte in den Studien nachgewiesen werden, dass die Vakzination mit HSP-Peptid-Komplexen prinzipiell



durchführbar ist, von den Patienten gut toleriert wird, kaum Nebenwirkungen verursacht und auch autoimmunologische Phänomene nicht zu beobachten waren. Anhand der bisherigen präliminären Ergebnisse muss die therapeutische Effizienz der HSP-Peptid-Vakzinen derzeit noch mit Zurückhaltung interpretiert werden.

Die Arbeit von Lewis macht jedoch auf ein weiteres Problem bei der Anwendung von HSP-Vakzinen aufmerksam. Von insgesamt 15 Patienten konnten in dieser Studie nur 3 Patienten vakziniert werden und nur bei einem Patienten ließ sich mittels Elispot-Assay eine Zunahme der Frequenz CD8-positiver T-Zellen im peripheren Blut nachweisen [105]. Die sterile Gewinnung einer ausreichenden Menge von Tumorgewebe stellt insbesondere bei kolorektalen Karzinomen und beim Pankreaskarzinom eine zusätzliche Problematik dar.

Das Konzept der Vakzination mit HSP-basierten Vakzinen ließe sich wesentlich vereinfachen, wenn HSP und antigene Peptide in vitro rekonstituiert werden und damit auch bekannte, synthetisch hergestellte Peptide zum Einsatz kommen könnten. Erste Hinweise auf die immunologische Aktivität in vitro rekonstituierter HSP-Peptid-Komplexe gibt es bereits. Blachere et al. konnten am murinen Modell zeigen, dass gp96- oder HSP70-Peptid-Komplexe mit einer Reihe verschiedener synthetischer Peptide in vitro generiert werden können, die synthetischen Peptide durch Makrophagen aufgenommen, erneut repräsentiert werden und letztlich damit eine CD8-positive T-Zell-Antwort ausgelöst werden kann [23]. Klinisch interessant wäre die Generation von HSP-Peptid-Vakzinen, die auf einem allogenen Ansatz unter in vitro Rekonstitution von HSP's mit gemeinsamen, bekannten, immunogenen Tumorantigenen beruhen. Dafür spricht ebenso die Tatsache, dass gemeinsame, immunogene und an HSP70-gekoppelte Peptide als exogene, zell-assoziierte Antigene (hier ein Tyrosinasepeptid aus Melanomzellen) durch DC's internalisiert und auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden können und so eine spezifische T-Zell-Antwort induzieren. Dieses Phänomen wurde als „Cross“-Präsentation bezeichnet [139].

Auch für die Erweiterung des Konzeptes synthetischer Vakzinen und ein potientiell Immunmonitoring ist die Methode der Aufreinigung von HSP-Peptid-Komplexen durch die Möglichkeit der Isolation und Identifizierung HSP70-gebundener Peptide von Bedeutung. Abbildung 42 demonstriert einen entsprechenden methodischen Algorithmus.

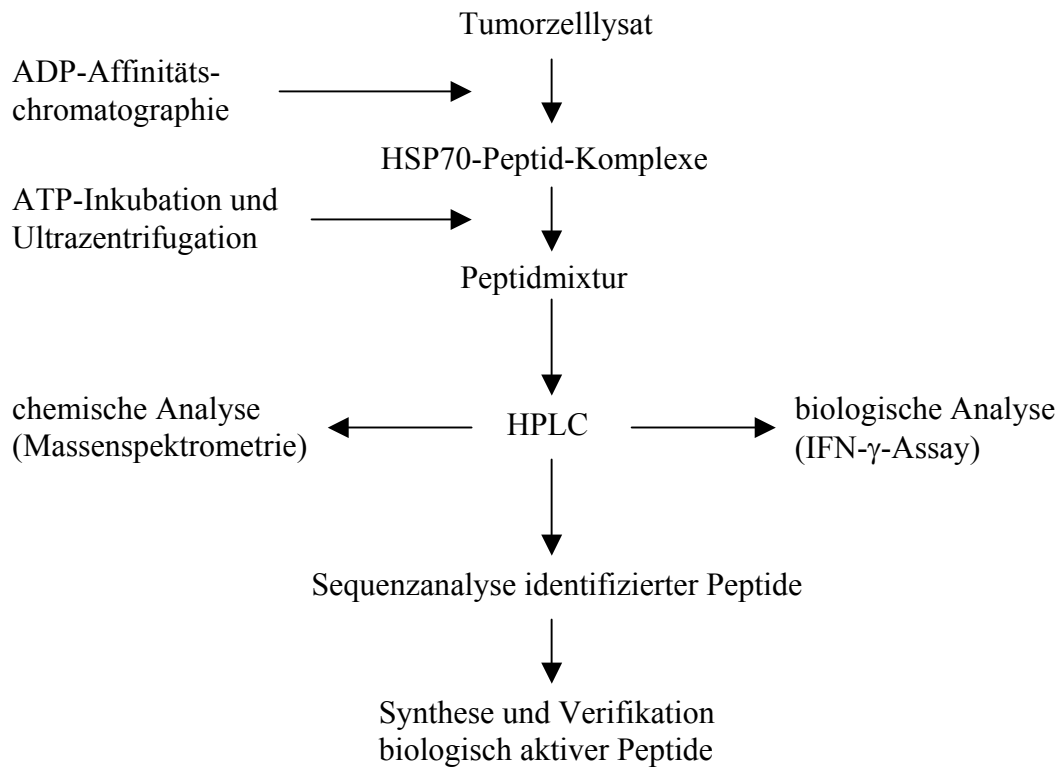


Abb. 42) Methodische Vorgehensweise zur Isolation, Identifizierung und Re-Synthese HSP70-gebundener Peptide.

Aus diesen Untersuchungen ließe sich ableiten, welches Spektrum an Peptiden durch Stressproteine überhaupt gebunden werden kann und ob die HSP-Bindung mit einer krankheitsbedingten Überrepräsentation bestimmter Peptide einhergeht. Für die klinische Situation würde dies die weitere Etablierung HSP-basierter Vakzinen rechtfertigen. Durch den interindividuellen Vergleich von HSP70-, gp96- und MHC-I-assoziierten Peptiden aus primären Tumoren könnten gemeinsame Peptide identifiziert werden. Nach deren Synthese ließe sich das immunogene Potential dieser Peptide durch Testung mit von Patienten gewonnenen T-Zellen prüfen. Damit könnte einerseits das Immunmonitoring von Patienten in klinischen Studie differenziert werden, andererseits ließen sich Rückschlüsse ableiten für die Etablierung komplexer synthetischer HSP-Peptid-Vakzinen zur Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms.

## **6. Zusammenfassung**

Die Zytokine Interleukin-2 und Interferon- $\alpha$ 2a nehmen eine zentrale Stellung bei der Behandlung von Patienten mit progredient metastasierten Nierenzellkarzinomen ein. Die aktuellen Literaturdaten sind jedoch hinsichtlich der Wirksamkeit dieser Zytokine sowie in Bezug auf Applikationsformen, Ansprechraten, Überlebenszeiten, Kombinationen und Dosierungen uneinheitlich und werden kontrovers diskutiert. Dadurch ist die Etablierung eines allgemein gültigen immuntherapeutischen Standards derzeit nicht möglich.

In Deutschland findet die Kombination von Interleukin-2, Interferon- $\alpha$ 2a, 5-Fluorourazil und 13-cis-Retinsäure, nicht zuletzt auf Grund ihrer Wirksamkeit, aber auch des Mangels an therapeutischen Alternativen, eine breite Anwendung.

Es war Zielstellung des klinischen Teils dieser Monographie, die Effektivität der Chemoimmuntherapie monozentrisch an 107 Patienten und speziellen Patientensubgruppen zu untersuchen, Prognosefaktoren zu identifizieren und Optimierungen des immuntherapeutischen Behandlungskonzeptes zu prüfen. Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Auswertung der perioperativen Daten und des klinischen Verlaufs von Patienten mit venösen Tumorthromben der Stadien III und IV nach Staehler mit dem Ziel, die Präsenz der venösen Tumorausdehnung in dieser Ausdehnung prognostisch zu bewerten. Des Weiteren sollte die Bedeutung des biologischen Markers TU M2-PK insbesondere als Verlaufsparemeter bei Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen unter Chemoimmuntherapie beurteilt werden.

Bei den 107 Patienten, die mit der Kombinationstherapie behandelt worden waren, zeigte sich eine Rate objektiver Remissionen von 22 % (95 % CI 14,6 – 31,3 %) mit einer zusätzlichen Rate an vorübergehenden Stabilisierungen von 46 %. Das mediane Überleben lag bei 19 Monaten mit einer kalkulierten 5-Jahres-Überlebensrate von 17 %. Es zeigte sich eine hochsignifikante Abhängigkeit vom Karnofsky-Performance-Index der Patienten. Bei den 83 Patienten mit einem Karnofsky-Performance-Index von über 80 % lag das mediane Überleben bei 23 Monaten mit einer kalkulierten 5-Jahres-Überlebensrate von 21 %. 13-cis-Retinsäure hatte in dieser Patientengruppe keinen Einfluss auf das Therapieergebnis, weder bezüglich des Ansprechverhaltens noch des medianen Überlebens. Die Untersuchungsergebnisse belegen die Wirksamkeit der Kombination von Interleukin-2, Interferon- $\alpha$ 2a und 5-Fluorourazil und rechtfertigen die weitere Prüfung dieses therapeutischen Konzeptes im Rahmen prospektiver klinischer Studien.

Die retrospektive Analyse von Patienten mit ungünstigen Metastasenlokalisationen, wie inoperablen ossären Metastasen oder lokalen Rezidiven, erbrachte Hinweise darauf, dass mit der synchronen Kombination von Chemoimmuntherapie und perkutaner Bestrahlung potentiell ein zusätzlicher therapeutischer Effekt erzielt werden könnte. Der Synergismus von Immun- und Strahlentherapie ist durch eine Reihe experimenteller Untersuchungen untermauert. Die ersten positiven klinischen Erfahrungen müssen jedoch in prospektiven Untersuchungen ihre Bestätigung finden.

Bei den 24 Patienten mit venösen Tumorthromben im Stadium III und IV nach Staehler, die an der Klinik und Poliklinik für Urologie der Charité operiert worden waren, betrug die peri- und postoperative Mortalität 4 %, es traten in 50 % postoperative Komplikationen auf. Die Patienten zeigten beim Vergleich des postoperativen Überlebens keine signifikanten Unterschiede zu einer Kontrollgruppe von 75 Patienten. In einer multivariaten Analyse erwies sich nur eine Metastasierung als signifikanter prognostischer Faktor, das Vorhandensein venöser Tumorthromben im Stadium III und IV hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten. Die Ergebnisse untermauern prinzipiell das aggressive Behandlungskonzept von Operation des Primärtumors und systemischer Immuntherapie bei nachgewiesener metastasierter Erkrankung.

Die tumorspezifische Form der M2-Pyruvatkinase (TU M2-PK) wurde auf der Basis aktueller Literaturbefunde als biologischer Marker untersucht. Beim Nierenzellkarzinom lag die Sensitivität für die organbegrenzte Erkrankung bei 27 % und für das metastasierte Stadium bei 67 %. Unter Chemoimmuntherapie ließ sich in 68 % der Fälle eine Korrelation zwischen Markerverlauf und Ansprechverhalten der Metastasen nachweisen. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass der Tumormarker weder für die Diagnostik maligner Raumforderungen der Niere, noch zur exakten Beurteilung des Erkrankungsverlaufes beim metastasierten Nierenzellkarzinom empfohlen werden kann.

Die in der Arbeit präsentierten Ergebnisse stehen vor dem Hintergrund des im Dezember 2002 gegründeten Intergrup Kompetenz Netzwerks Nierentumoren (IKN-N). Das IKN-N bietet die Möglichkeit, unter Einbeziehung verschiedener, an der Therapie von Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen beteiligter Fachrichtungen, Therapieoptionen zu bündeln und in nationale Studienprojekte zu integrieren. Dabei sollen sowohl „First-line“-, als auch „Second-line“-Behandlungskonzepte Berücksichtigung finden. Ebenso gilt es, Subgruppen von Patienten zu identifizieren, bei denen spezielle Indikationen, z.B. die alleinige Metastasen Chirurgie, die Kombination von Chemoimmuntherapie und Bestrahlung oder die allogene Stammzelltransplantation sinnvolle therapeutische Maßnahmen darstellen.

Für die Behandlung des metastasierten NZK in Deutschland stellt die Gründung des IKN-N eine wichtige Plattform dar, um die klinische Forschung zu entwickeln, Aktivitäten zu koordinieren und somit an der klinischen Etablierung eines allgemein gültigen Behandlungsstandards mitzuwirken.

In Weiterführung der klinischen Aspekte dieser Arbeit zur zytokinbasierten Immuntherapie war es die Aufgabenstellung des experimentellen Teils, die Bedeutung des 72 kDa HSP beim Nierenzellkarzinom zu untersuchen. Hitzeschockproteine der 70 kDa Familie (HSP72 und HSP73) haben neben ihrer Funktion im Rahmen der zellulären Stressverarbeitung eine außerordentliche Bedeutung für tumorimmunologische Fragestellungen erlangt. Diese ergeben sich aus der immunologischen Signalfunktion, der HSP72-vermittelten Interaktion von immunologischen Effektorzellen mit Tumorzellen und der Beteiligung von HSP70 an der Peptidprozessierung in malignen Zellen.

An der Nierenkarzinomzelllinie ACHN und an Primärzellen von Nierenkarzinomen konnte HSP72 durchflusszytometrisch auf der Zelloberfläche nachgewiesen und die HSP72-Oberflächenexpression auf ACHN-Zellen mit einer erhöhten Lyse der Tumorzellen durch Interleukin-2 stimulierte NK-Zellen korreliert werden. Im Gegensatz zu bisherigen Literaturbefunden zeigte sich in diesem Modell jedoch, dass die Membranexpression von HSP72 nicht nur auf maligne Zellen beschränkt, sondern auch bei renalen Zellen aus Normalgewebe nachzuweisen war. Diese Membranexpression könnte im Zusammenhang mit der starken basalen zytoplasmatischen HSP72-Expression in Tubuluszellen stehen. Dementsprechend muss die HSP72-vermittelte Lyse durch IL-2 stimulierte NK-Zellen als ein komplexes Phänomen betrachtet werden, dessen vollständige Aufklärung weiterer experimenteller Untersuchungen bedarf.

In der immunhistochemischen Studie zur basalen, zytoplasmatischen HSP72-Expression zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen einer starken HSP72-Expression und dem Überleben der Patienten. Interessanterweise überlebten auch immuntherapierte Patienten mit einer hohen HSP72-Expression signifikant länger als Patienten mit einer geringen Expression des Proteins im Primärtumor. Differenzen zwischen dem Primärtumor und den Metastasen zeigten sich nicht. In einer multivariaten Analyse konnte das Ausmaß der HSP72-Expression als unabhängiger prognostischer Parameter identifiziert werden. Damit steht ein biologischer Marker zur Verfügung, der auf molekularer Ebene mit dem Ansprechen auf eine Chemoimmuntherapie korreliert. Die Einführung des Parameters in die klinische Routine wird an höheren Patientenzahlen zeigen, inwieweit die HSP72-Expression als prognostischer Marker geeignet ist.

Die klinische Etablierung spezifisch wirksamer Vakzinen nimmt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung neuer Behandlungsmethoden des metastasierten Nierenzellkarzinoms ein. Dabei spielen Vakzinen auf der Basis von HSP-Peptid-Komplexen eine besondere Rolle. Ein weiterer Bestandteil der experimentellen Arbeiten war die Entwicklung einer Methode zur Aufreinigung von HSP70-Peptid-Komplexen. Mit der ADP-Affinitätschromatographie konnte eine Methode zur Anwendung gebracht und patentiert werden, durch die sich HSP70-Peptid-Komplexe aus Tumorzellen anreichern lassen. Die HSP70-Peptid-Komplexe sind einerseits für HSP-basierte Vakzinekonzepte verfügbar oder können andererseits für die Identifikation und Charakterisierung HSP70-gebundener biologisch-aktiver (immunogener) Peptide genutzt werden.

Aktuelle Literaturbefunde belegen die außerordentliche Bedeutung von Hitzeschockproteinen in der Immunologie maligner Tumoren. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse demonstrieren, dass HSP72 per se eine prognostische Bedeutung beim Nierenzellkarzinom besitzt und weisen auf die potentielle Bedeutung von HSP72 als immunologische Zielstruktur hin. Die Resultate stellen neue Ansätze zum tieferen Verständnis der immunogenen Eigenschaften des Nierenzellkarzinoms dar und liefern Ausgangspunkte für die Etablierung innovativer Vakzinationskonzepte bei der Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms.

## **Literaturverzeichnis**

1. Adil G, Murat D, Ayhan O, Ozgur TM, Ibrahim Y, Fuat PA, Rifki F. Renal cell carcinoma metastasis to the parotid gland. *BJU Int* 1999;83:861-862.
2. Allan MJ, Vaughan M, Webb A, Johnston S, Savage P, Eisen T, Bate S, Moore J, Ahern R, Gore ME. Protracted venous infusion 5-fluorouracil in combination with subcutaneous interleukin-2 and alpha-interferon in patients with metastatic renal cell cancer: a phase II study. *Br J Cancer* 2000;83:980-985.
3. Altmeyer A, Maki RG, Feldtweg AM, Heike M, Protopopov V, Masur SK, Srivastava PK. Tumor-specific cell surface expression of the -kdel containing, endoplasmatic reticular heat shock protein gp96. *Int J Cancer* 1996;69:340-349.
4. Amato RJ, Murray L, Wood L, Savary C, Tomasovic S, Reitsma D. Active specific immunotherapy in patients with renal cell carcinoma (RCC) using autologous tumor derived heat shock protein-peptide complex-96 (HSPP-96) vaccine. *Proc ASCO* 1999;18:332a.
5. Amato RJ. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 2000;27:177-186.
6. Amato RJ, Wood LS, Savary C, Wood C, Hawkins EA, Reitsma DG, Srivastava P. Patients with renal cell carcinoma (RCC) using autologous tumor-derived heat shock protein-peptide complex (HSPPC-96) with or without interleukin-2. *Proc ASCO* 2000;19:454a.
7. Arnold-Schild D, Hanau D, Spehner D, Schmid C, Rammensee HG, de-la-Salle H, Schild H. Cutting-edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol* 1999;162:3757-3760.
8. Assikis VJ, Daliani D, Pagliaro L, Wood C, Perez C, Logothetis C, Papandreou C, Hawkins ES, Srivastava PK. Phase II study of an autologous tumor derived heat shock protein-peptide complex vaccine (HSPPC-96) for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Proc ASCO* 2003;22:1552.
9. Athanassiadou P, Petrakakou E, Sakelariou V, Zerva C, Liossi A, Michalas S, Athanassiades P. Expression of p53, bcl-2 and heat shock protein (hsp72) in malignant and benign ovarian tumours. *Eur J Cancer Prev* 1998;7:225-231.
10. Atzpodien J, Korfer A, Franks CR, Poliwoda H, Kirchner H. Home therapy with recombinant interleukin-2 and interferon-alpha 2b in advanced human malignancies. *Lancet* 1990;335:1509-1512.
11. Atzpodien J, Kirchner H, Korfer A, Hadam M, Schomburg A, Menzel T, Deckert M, Franzke A, Volkenandt M, Dallmann I, et al. Expansion of peripheral blood natural killer cells correlates with clinical outcome in cancer patients receiving recombinant subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha-2. *Tumour Biol* 1993;14:354-359.
12. Atzpodien J, Kirchner H, Duensing S, Lopez Hanninen E, Franzke A, Buer J, Probst M, Anton P, Poliwoda H. Biochemotherapy of advanced metastatic renal-cell carcinoma: results of the combination of interleukin-2, alpha-interferon, 5-fluorouracil, vinblastine, and 13-cis-retinoic acid. *World J Urol* 1995;13:174-177.
13. Atzpodien J, Lopez-Hanninen E, Kirchner H, Bodenstern H, Pfreundschuh M, Rebmann U, Metzner B, Illiger HJ, Jakse G, Niesel T, Scholz HJ, Wilhelm S, Pielmeier T, Zakrzewski G, Blum G, Beier J, Müller GW, Duensing S, Anton P, Allhof EP, Jonas U, Poliwoda H. Multi-institutional home-therapy trial of recombinant human interleukin-2 and interferon alpha-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1995;13:497-501.
14. Atzpodien J, Buer J, Sel S, Janssen J, Oevermann K. Chemoimmunotherapy in the systemic treatment of advanced renal carcinoma. *Urologe A* 1999;38:474-478.

15. Atzpodien J, Kirchner H, Illiger HJ, Metzner B, Ukena D, Schott H, Funke PJ, Gramatzki M, Jurgenson S, Wandert T, Patzelt T, Reitz M. IL-2 in combination with IFN- alpha and 5-FU versus tamoxifen in metastatic renal cell carcinoma: long-term results of a controlled randomized clinical trial. *Br J Cancer* 2001;85:1130-1136.
16. Atzpodien J, Hoffmann R, Franzke M, Stief C, Wandert T, Reitz M. Thirteen-year, long-term efficacy of interferon 2alpha and interleukin 2-based home therapy in patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2002;95:1045-1050.
17. Atzpodien J, Kirchner H, Jonas U, Bergmann L, Schott H, Heynemann H, Loening SA, Roigas J, Müller SC, Westerhausen H, Helbig H, Bodenstein H, Pomer S, Metzner B, Rebmann U, Hofstetter A, Oberneder R, Wandert T, Patzelt T, Reitz M, and DGCIN-German Cooperative Renal Carcinoma Chemo-Immunotherapy Trials Group. 13cis-retinoic acid, IFN-alpha2a, IL-2 and chemotherapy in advanced renal cell carcinoma: results of a prospectively randomized trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). In press, *J Clin Oncol*, 2003.
18. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 2001;14:303-313.
19. Belli F, Testori A, Rivoltini L, Maio M, Andreola G, Sertoli MR, Gallino G, Piris A, Cattelan A, Lazzari I, Carrabba M, Scita G, Santantonio C, Pilla L, Tragni G, Lombardo C, Arienti F, Marchiano A, Queirolo P, Bertolini F, Cova A, Lamaj E, Ascani L, Camerini R, Corsi M, Cascinelli N, Lewis JJ, Srivastava P, Parmiani G. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *J Clin Oncol* 2002;20:4169-4180.
20. Bex A, Geis C, Metz K, Kasimir-Bauer S, Scheulen ME, Otte T, Rübber H. Expression of heat shock proteins 27 and 70 in renal cell cancer and normal tissue: An immunohistochemical study. *Onkologie* 1999;22:236-239.
21. Binder RJ, Han DK, Srivastava PK. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol* 2000;1:151-155.
22. Binder RJ, Blachere NE, Srivastava PK. Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *J Biol Chem* 2001;276:17163-17171.
23. Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, Suto R, Navdeep S, Jaikaria NS, Basu S, Udon H, Srivastava PK. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med* 1997;186:1315-1322.
24. Blom DJ, De Waard-Siebinga I, Apte RS, Luyten GP, Niederkorn JY, Jager MJ. Effect of hyperthermia on expression of histocompatibility antigens and heat-shock protein molecules on three human ocular melanoma cell lines. *Melanoma Res* 1997;7:103-109.
25. Bloom HJ. Medroxyprogesterone acetate (Provera) in the treatment of metastatic renal cancer. *Br J Cancer* 1971;25:250-265.
26. Bonay M, Soler P, Riquet M, Battesti JP, Hance AJ, Tazi A. Expression of heat shock proteins in human lung and lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;10:453-461.
27. Botzler C, Issels R, Multhoff G. Heat-shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43:226-230.
28. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
29. Breloer M, Fleischer B, von Bonin A. In vivo and in vitro activation of T cells after administration of Ag-negative heat shock proteins. *J Immunol* 1999;162:3141-3147.



30. Breloer M, Marti T, Fleischer B, von Bonin A. Isolation of processed, H-2K<sup>b</sup>-binding ovalbumin-derived peptides associated with the stress proteins HSP70 and GP96. *Eur J Immunol* 1998;28:1016-1021.
31. Brink U, Eigenbrodt E, Oehmke M, Mazurek S, Fischer G. L- and M2- pyruvate kinase expression in renal cell carcinomas and their metastases. *Virchows Arch* 1994;424:177-185.
32. Brinkmann OA, Bruns F, Prott FJ, Hertle L: Possible synergy of radiotherapy and chemo-immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma (RCC). *Anticancer Res* 1999;19:1583-1587.
33. Brinkmann OA, Herwig R, Hertle L. Role of natural killer cells for the treatment of metastatic renal cell carcinoma (MRCC). *J Urol* 2000;4(Suppl):111.
34. Brinkmann OA, Roigas J, Hertle L. Systemic immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma and long-term outcome. *Urologe A* 2002;41:231-238.
35. Castelli C, Ciupitu AM, Rini F, Rivoltini L, Mazzocchi A, Kiessling R, Parmiani G. Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antimelanoma T cells. *Cancer Res* 2001;61:222-227.
36. Chakrabarty A, Hillman GG, Maughan RL, Ali E, Pontes JE, Haas GP. Radiation therapy enhances the therapeutic effect of immunotherapy on pulmonary metastases in a murine renal adenocarcinoma model. *In Vivo* 1994;8:25-31.
37. Ciancio G, Hawke C, Soloway M. The use of liver transplant techniques to aid in the surgical management of urological tumors. *J Urol* 2000;164:665-672.
38. Ciocca DR, Fuqua SA, Lock-Lim S, Toft DO, Welch WJ, McGuire WL. Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1992;52:3648-3654.
39. Coppin C, Porzolt F, Kumpf J, Coldmann A, Wilt T. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;3:1-27(CD001425).
40. Dee SL, Eshghi M, Otto CS. Laryngeal metastasis 7 years after radical nephrectomy. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1833-1834.
41. DiBiase SJ, Valicenti RK, Schultz D, Xiem Y, Gomella LG, Corn BW. Palliative irradiation for focally symptomatic metastatic renal cell carcinoma: Support for dose escalation based on a biological model. *J Urol* 1997;158:746-749.
42. DiCesare S, Poccia F, Mastino A, Colizzi V. Surface expressed heat-shock proteins by stressed or human immunodeficiency virus (HIV)-infected lymphoid cells represent the target for antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Immunology* 1992;76:341-343.
43. Dressel R, Lubbers M, Walter L, Herr W, Gunther E. Enhanced susceptibility to cytotoxic T lymphocytes without increase of MHC class I antigen expression after conditional overexpression of heat shock protein 70 in target cells. *Eur J Immunol* 1999;29:3925-3935.
44. Durr HR, Maier M, Pfahler M, Baur A, Refior HJ. Surgical treatment of osseous metastases in patients with renal cell carcinoma. *Clin Orthop* 1999;367:283-290.
45. Dutcher JP, Logan T, Gordon M, Sosman J, Weiss G, Margolin K, Plasse T, Mier J, Lotze M, Clark J, Atkins M. Phase II trial of interleukin-2, interferon-alpha, and 5-fluorouracil in metastatic renal cell cancer: A cytokine working group study. *Clin Cancer Res* 2000;6:3442-3450.
46. Dybal EJ, Haas GP, Maughan RL, Sud S, Pontes JE, Hillman GG. Synergy of radiation therapy and immunotherapy in murine renal cell carcinoma. *J Urol* 1992;148:1331-1337.
47. Eigenbrodt E, Basenau D, Holthausen S, Mazurek S, Fischer G. Quantification of tumor type M2 pyruvate kinase (TUM2-PK) in human carcinomas, *Anticancer Res* 1997;17:3153-3156.

48. Elias L, Binder M, Mangalik A, Clark D, Morrison B, Altobelli KK, Smith A. Pilot trial of infusional 5-fluorouracil, interleukin-2, and subcutaneous interferon- $\alpha$  for advanced renal cell carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1999;22:156-161.
49. Ferrarini M, Heltai S, Zocchi RM, Rugarli C. Unusual expression and localization in heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer* 1992;51:613-619.
50. Ficarra V, Righetti R, D'Amico A, Rubilotta E, Novella G, Malossini G, Mobilio G. Renal vein and vena cava involvement does not affect prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Oncology* 2001;61:10-15.
51. Figlin RA. Review article - Renal cell carcinoma: Management of advanced disease. *J Urol* 1999;161:381-386.
52. Finney R. The value of radiotherapy in the treatment of hypernephroma--a clinical trial. *Br J Urol* 1973;45:258-269.
53. Fischer G, Holzrichter S, Reinacher M, Heinrichs M, Dembowski J, Eigenbrodt E. Immunohistochemical demonstration of L- and M2-pyruvate kinase in primary renal cell carcinomas and their metastases. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1989;73:422-443.
54. Fisher RI, Rosenberg SA, Fyfe G. Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J Sci Am* 2000;6:55-57.
55. Flanigan RC, Salmon SE, Blumenstein BA, Bearman SI, Roy V, McGrath PC, Caton JR Jr, Munshi N, Crawford ED. Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer, *N Engl J Med* 2001;345:1655-1659.
56. Flanigan R. Commentary. *Urologic Oncology* 2002;7:84.
57. Fojo AT, Shen DW, Mickley LA, Pastan I, Gottesman MM. Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene. *J Clin Oncol* 1987;5:1922-1927.
58. Fossa SD, Kjolseth I, Lund G. Radiotherapy of metastases from renal cancer. *Eur Urol* 1982;8:340-342.
59. Fossa SD, Lien HH, Lindegaard M. Effect of recombinant interferon alfa on bone metastases of renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:633-634.
60. Gaudin C, Kremer F, Angevin E, Scott V, Triebel F. A hsp70-2 mutation recognized by CTL on a human renal cell carcinoma. *J Immunol* 1999;162:1730-1738.
61. Gerner EW, Schneider MJ. Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature* 1975;256:500-502.
62. Gershanovich MM, Moiseyenko VM, Vorobjev AV, Kapyla H, Ellmen J, Anttila M. High-dose toremifene in advanced renal-cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997;39:547-551.
63. Giehl JP, Kluba T. Metastatic spine disease in renal cell carcinoma--indication and results of surgery. *Anticancer Res* 1999;19:1619-1623.
64. Gross C, Hansch D, Gastpar R, Multhoff G. Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94. *Biol Chem* 2003;384:267-279.
65. Gschwend J, Maier S, Flohr P, de Petroni R, Hautmann RE. Venous tumor invasion by renal cell carcinoma. Surgical technique, complications and survival rate. *Urologe A* 1994;33:440-446.
66. Guinan P, Sobin LH, Algaba F, Badellino F, Kameyama S, MacLennan G, Novick A. TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997;80:992-993.
67. Hantschel M, Pfister K, Jordan A, Scholz R, Andreesen R, Schmitz G, Schmetzer H, Hiddemann W, Multhoff G. Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients. *Cell Stress Chaperones* 2000;5:438-442.

68. Heffess CS, Wenig BM, Thompson LD. Metastatic renal cell carcinoma to the thyroid gland: a clinicopathologic study of 36 cases. *Cancer* 2002;95:1869-1878.
69. Heike M, Hertkorn C, Reitsma DJ, Kommoss F, Simiantonaki N, Woelfel T, Dippold WG, Junginger T, Srivastava PK, Galle PR. Pilot trial of vaccination with autologous tumor-derived gp96 heat shock protein-peptide complex (HSPPC-96) in patients after surgery for gastric carcinoma. *Proc ASCO* 2000;19:466a.
70. Heinze G, Schemper M. A solution to the problem of monotone likelihood in Cox regression. *Biometrics* 2001;57:114-119.
71. Henle KJ, Leeper DB. Interaction of hyperthermia and radiation in CHO cells: recovery kinetics. *Radiat Res* 1976;66:505-518.
72. Henle KJ, Dethlefsen LA. Heat fractionation and thermotolerance: a review. *Cancer Res* 1978;38:1843-1851.
73. Henson DE, Fielding LP, Grignon DJ, Page DL, Hammond ME, Nash G, Pettigrew NM, Gorstein F, Hutter RV. College of American Pathologists Conference XXVI on clinical relevance of prognostic markers in solid tumors. Summary. Members of the Cancer Committee. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119:1109-1112.
74. Hettinga JV, Lemstra W, Konings AW, Kampinga HH. Cisplatin sensitivity and thermochemosensitisation in thermotolerant cDDP-sensitive and -resistant cell lines. *Br J Cancer* 1995;71:498-504.
75. Heufelder AE, Wenzel BE, Bahn RS. Cell surface localization of a 72 kilodalton heat shock protein in retro-ocular fibroblasts from patients with Grave's ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:732-736.
76. Hightower LE, Guidon PT Jr. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J Cell Physiol* 1989;138:257-266.
77. Hirai I, Sato N, Qi W, Ohtani S, Torigoe T, Kikuchi K. Localization of pNT22 70 kDa heat shock cognate-like protein in the plasma membrane. *Cell Struct Funct* 1998;23:153-158.
78. Hock LM, Lynch J, Balaji KC. Increasing incidence of all stages of kidney cancer in the last 2 decades in the United States: an analysis of surveillance, epidemiology and end results program data. *J Urol* 2002;167:57-60.
79. Hoffman AD, Engelstein D, Bogenrieder T, Papandreou CN, Steckelman E, Dave A, Motzer RJ, Dmitrovsky E, Albino AP, Nanus DM. Expression of retinoic acid receptor beta in human renal cell carcinomas correlates with sensitivity to the antiproliferative effects of 13-cis-retinoic acid. *Clin Cancer Res* 1996;2:1077-1082.
80. Hofmockel G, Langer W, Theiss M, Gruss A, Frohmuller HGW. Chemoimmunotherapy for metastatic renal cell carcinoma using a regimen of interleukin-2, interferon-alpha and 5-fluorouracil. *J Urol* 1996;156:18-21.
81. Hugo F, Fischer G, Eigenbrodt E. Quantitative detection of tumor M2-PK in serum and plasma. *Anticancer Res* 1999;19:2753-2757.
82. Huland E, Heinzer H, Timm S, Alamian M, Huland H. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma in Germany. An assessment of the current status. *Urologe A* 2002;41:282-287.
83. Huot J, Roy G, Lambert H, Chretien P, Landry J. Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein. *Cancer Res* 1991;51:5245-5252.
84. Ishii T, Udono H, Yamano T, Ohta H, Uenaka A, Ono T, Hizuta A, Tanaka N, Srivastava PK, Nakayama E. Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96. *J Immunol* 1999;162:1303-1309.

85. Ito A, Shinkai M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Augmentation of MHC class I antigen presentation via heat shock protein expression by hyperthermia. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:515-522.
86. Jacobsen KD, Folleras G, Fossa SD. Metastases from renal cell carcinoma to the humerus or the shoulder girdle. *Br J Urol* 1994;73:124-128.
87. Janetzki S, Palla D, Rosenhauer V, Lochs H, Lewis JJ, Srivastava PK. Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study. *Int J Cancer* 2000;88:232-238.
88. Jayson M, Sanders H. Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology* 1998;51:203-205.
89. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003;53:5-26.
90. Jung MY, Huryk RF, Yoshimura I, Fair WR, Gregor PD. Protective immunity to Dunning G tumor in rats immunized with heat shock protein gp96 purified from G tumor. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 1996;37:A3165.
91. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am statist Assoc* 1958;53:457-481.
92. Kaplan S, Ekici S, Dogan R, Demircin M, Ozen H, Pasaoglu I. Surgical management of renal cell carcinoma with inferior vena cava tumor thrombus. *Am J Surg* 2002;183:292-299.
93. Kaufmann SH. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 1990;11:129-136.
94. Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Expression of 70-kDa heat shock protein in oral lesions: marker of biological stress or pathogenicity. *Oral Oncol* 1998;34:496-501.
95. Kaur J, Das SN, Srivastava A, Ralhan R. Cell surface expression of 70 kDa heat shock protein in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathological features. *Oral Oncol* 1998;34:93-98.
96. Kjaer M, Frederiksen PL, Engelholm SA. Postoperative radiotherapy in stage II and III renal adenocarcinoma. A randomized trial by the Copenhagen Renal Cancer Study Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987;13:665-672.
97. Klapdor R, Bahlo M, Fenner C. Tumormarker M2-PK in the follow up of pancreatic and colorectal cancer disease. Abstract, 10<sup>th</sup> International Hamburg Symposium on Tumor markers, Hamburg, Deutschland, 05.-07.12.1999.
98. Kohler G, Veelken H, Rosenthal F, Mackensen A, Lindemann A, Schaefer HE, Lahn M. Oncogene and HSP-70 expression in primary tumor cell cultures of renal cell carcinoma compared to their corresponding cell line. *Anticancer Res* 1997;17:3225-3231.
99. Koshiyama M, Konishi I, Mandai M, Komatsu T, Yamamoto S, Nanbu K, Mori T. Immunohistochemical analysis of p53 protein and 72 kDa heat shock protein (HSP72) expression in ovarian carcinomas. Correlation with clinicopathology and sex steroid receptor status. *Virchows Arch* 1995;425:603-609.
100. Kubista B, Trieb K, Blahovec H, Kotz R, Micksche M. Hyperthermia increases the susceptibility of chondro- and osteosarcoma cells to natural killer cell-mediated lysis. *Anticancer Res* 2002;22:789-792.
101. Kuczyk MA, Bokemeyer C, Kohn G, Stief CG, Machtens S, Truss M, Hofner K, Jonas U. Prognostic relevance of intracaval neoplastic extension for patients with renal cell cancer. *Br J Urol* 1997;80:18-24.
102. Kuczyk M, Munch T, Machtens S, Wunning T, Grunewald V, Stief CG, Hofner K, Jonas U. Therapy for kidney cell carcinoma with cava thrombus. Importance of extracorporeal circulation and prognostic value of cranial tumor extension. *Urologe A* 1999;38:460-465.

103. Lammert E, Arnold D, Nijenhuis M, Momburg F, Hämmerling GJ, Brunner J, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H. The endoplasmatic reticulum-resident stress protein gp96 binds peptides translocated by TAP. *Eur J Immunol* 1997;27:923-927.
104. Levy DA, Slaton JW, Swanson DA, Dinney CP. Stage specific guidelines for surveillance after radical nephrectomy for local renal cell carcinoma. *J Urol* 1998;159:1163-1167.
105. Lewis JJ, Janetzki S, Livingston PO, Desantis D, Williams L, Klimstra D, Reistma D, Houghton AN, Srivastava P. Pilot trail of vaccination with autologous tumor derived gp96 heat shock protein-peptide complex (HSPPC-96) in patients with resected pancreatic adenocarcinoma. *Proc ASCO* 1999;18:1687a.
106. Li GC, Mivechi NF, Weitzel G. Heat shock proteins, thermotolerance, and their relevance to clinical hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 1995;11:459-488.
107. Lichtenfels R, Kellner R, Bukur J, Beck J, Brenner W, Ackermann A, Seliger B. Heat shock protein expression and anti-heat shock protein reactivity in renal cell carcinoma. *Proteomics* 2002;2:561-570.
108. Lopez Hanninen E, Kirchner H, Atzpodien J. Interleukin-2 based home therapy of metastatic renal cell carcinoma: risks and benefits in 215 consecutive single institution patients. *J Urol* 1996;155:19-25.
109. Luftner D, Mesterharm J, Akrivakis C, Geppert R, Petrides PE, Wernecke KD, Possinger K. Tumor type M2 pyruvate kinase expression in advanced breast cancer, *Anticancer Res* 2000;20:5077-5082.
110. Mantel N, Haenszel W: Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst* 1959;22:719-748.
111. Matzinger P. An innate sense of danger. *Semin Immunol* 1998;10:399-415.
112. Mazurek S, Scheefers-Borchel U, Scheefers H, Michel A, Basenau D, Fischer G, Dahlmann N, Laumen R, Eigenbrodt E. Die Bedeutung der Pyruvatkinase in der Onkologie. *Notabene Medici* 1993;3:97-103.
113. Mazzaferro V, Coppa JC, Carrabba M, Rivoltini L, Schiavo M, Marchiano A, Romito R, Pulvirenti A, Camerini T, Regalia E, Gianessi W, Camerini R, Lewis JJ, Srivastava PK, Parmiani G. Vaccination with autologous tumor derived heat shock protein peptide complex gp-96 (HSPPC-96) following curative resection of colorectal liver metastases. *Proc ASCO* 2001;20:256a.
114. Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. Interferon-alpha and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial. *Lancet* 1999;353:14-17.
115. Metzner B, Siegmund R, Kirchner H, Atzpodien J, Illiger HJ. Sprechen Knochenmetastasen auf eine Immuntherapie mit Interleukin-2 und Interferon-alpha-2b beim Nierenzellkarzinom an? *Tumordiagn u Ther* 1991;12:192-6.
116. Mickisch G, Carballido J, Hellsten S, Schulze H, Mensink H. Guidelines on renal cell cancer. *Eur Urol* 2001;40:252-255.
117. Mickisch GH, Garin A, van Poppel H, de Prijck L, Sylvester R. Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:966-970.
118. Molto L, Carballido J, Manzano L, Martinez-Martin B, Esquivel F, Chafer J, Olivier C, Alvarez-Mon M. Immunological changes in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic renal cell carcinoma after low doses of subcutaneous immunotherapy with IFN-alpha-2b and IL-2. *J Immunother* 1999;22:260-267.
119. Moseley PL. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J Appl Physiol* 1997;83:1413-1417.

120. Motzer RJ, Schwartz L, Law TM, Murphy BA, Hoffman AD, Albino AP, Vlamis V, Nanus DM. Interferon alfa-2a and 13-cis-retinoic acid in renal cell carcinoma: antitumor activity in a phase II trial and interactions in vitro. *J Clin Oncol* 1995;13:1950-1957.
121. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 1996;335:865-875.
122. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1999;17:2530-2540.
123. Motzer RJ, Murphy BA, Bacik J, Schwartz LH, Nanus DM, Mariani T, Loehrer P, Wilding G, Fairclough DL, Cella D, Mazumdar M. Phase III trial of interferon alfa-2a with or without 13-cis-retinoic acid for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2000;18:2972-2980.
124. Motzer RJ, Russo P. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J Urol* 2000;163:408-417.
125. Multhoff G, Botzler K, Wiesnet M, Müller E, Meier T, Wilmanns W, Issels RD. A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer* 1995;61:272-279.
126. Multhoff G, Botzler K, Wiesnet M, Eißner G, Issels RD. CD3+ large granular lymphocytes recognize a heat-inducible immunogenic determinant associated with the 72-kD heat shock protein on human sarcoma cells. *Blood* 1995;86:1374-1382.
127. Multhoff G, Hightower LE. Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chaperones* 1996;1:167-176.
128. Multhoff G. Heat shock protein 72 (HSP72), a hyperthermia-inducible immunogenic determinant on leukemic K562 and Ewing's sarcoma cells. *Int J Hyperthermia* 1997;13:39-48.
129. Multhoff G, Botzler C, Jennen L, Schmidt J, Ellwart J, Issels R. Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J Immunol* 1997;158:4341-4350.
130. Multhoff G, Botzler C, Issels R. The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response. *Biol Chem* 1998;379:295-300.
131. Multhoff G, Mizzen L, Winchester CC, Milner CM, Wenk S, Eissner G, Kampinga HH, Laumbacher B, Johnson J. Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp Hematol* 1999;27:1627-1636.
132. Multhoff G, Pfister K, Gehrmann M, Hantschel M, Gross C, Hafner M, Hiddemann W. A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity. *Cell Stress Chaperones* 2001;6:337-344.
133. Multhoff G. Activation of natural killer cells by heat shock protein 70. *Int J Hyperthermia* 2002;18:576-585.
134. Musch MW, Kaplan B, Chang EB. Role of increased basal expression of heat shock protein 72 in colonic epithelial c2BBE adenocarcinoma cells. *Cell Growth Differ* 2001;12:419-426.
135. Naitoh J, Kaplan A, Dorey F, Figlin R, Belldegrun A. Metastatic renal cell carcinoma with concurrent inferior vena caval invasion: Long-term survival after combination therapy with radical nephrectomy, vena caval thrombectomy and postoperative immunotherapy. *J Urol* 1999;162:46-50.
136. Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard JY, Savary J, Chevreau C, Ravaud A, Mercatello A, Peny J, Mousseau M, Philip T, Tursz T. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Groupe Francais d'Immunotherapie. N Engl J Med* 1998;338:1272-1278.

137. Negrier S, Caty A, Lesimple T, Douillard J-Y, Escudier B, Rossi J-F, Viens P, Gomez F. Treatment of patients with metastatic renal carcinoma with a combination of subcutaneous interleukin-2 and interferon alfa with or without fluorouracil. *J Clin Oncol* 2000;18:4009-4015.
138. Nishisaka N, Jones RF, Morse P, Kuratsukuri K, Romanowski R, Wang CY, Haas GP. Inhibition of lung metastases of murine renal cell carcinoma by the combination of radiation and interferon-alpha-producing tumor cell vaccine. *Cytokines Cell Mol Ther* 2000;6:199-206.
139. Noessner E, Gastpar R, Milani V, Brandl A, Hutzler PJ, Kuppner MC, Roos M, Kremmer E, Asea A, Calderwood SK, Issels RD. Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *J Immunol* 2002;169:5424-5432.
140. Oesterreich S, Schunck H, Benndorf R, Bielka H. Cisplatin induces the small heat shock protein hsp25 and thermotolerance in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;180:243-248.
141. Oremek GM, Eigenbrodt E, Rädle J, Zeuzem ST, Seiffert U. Value of the serum levels of the tumor marker TUM2-PK in pancreatic cancer. *Anticancer Res* 1997;17:3031-3034.
142. Oremek GM, Teigelkamp S, Kramer W, Eigenbrodt E, Usadel K-H. The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 (TUM2-PK) as a tumor marker for renal cell carcinoma, *Anticancer Res* 1999;19:2599-2601.
143. Palleros DR, Shi L, Reid KL, Fink AL. HSP70-Protein Complexes: Complex stability and conformation of bound substrate protein. *J Biol Chem* 1994;269:13107-13114.
144. Pantuck AJ, Zisman A, Belldegrun AS. The changing natural history of renal cell carcinoma. *J Urol* 2001;166:1611-1623.
145. Pavone L, Andrulli S, Santi R, Majori M, Buzio C. Long-term treatment with low doses of interleukin-2 and interferon-alpha: immunological effects in advanced renal cell cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:82-86.
146. Peng P, Ménoret A, Srivastava PK. Purification of immunogenic heat shock protein 70-peptide complexes by ADP-affinity chromatography. *J Immunol Meth* 1997;204:13-21.
147. Phillips JH, Lanier LL. Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytotoxicity. *J Exp Med* 1986;164:814-825.
148. Plawner J. Results of surgical treatment of kidney cancer with solitary metastasis to contralateral adrenal. *Urology* 1991;37:233-236.
149. Protti MP, Heltai S, Bellone M, Ferrarini M, Manfredi AA, Rugarli C. Constitutive expression of the heat shock protein 72 kDa in human melanoma cells. *Cancer Lett* 1994;85:211-216.
150. Pyrhonen S, Salminen E, Ruutu M, Lehtonen T, Nurmi M, Tammela T, Juusela H, Rintala E, Hietanen P, Kellokumpu-Lehtinen PL. Prospective randomized trial of interferon alfa-2a plus vinblastine versus vinblastine alone in patients with advanced renal cell cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:2859-2867.
151. Rabinovitch RA, Zelefsky MJ, Gaynor JJ, Fuks Z. Patterns of failure following surgical resection of renal cell carcinoma: implications for adjuvant local and systemic therapy. *J Clin Oncol* 1994;12:206-212.
152. Ravaud A, Audhuy B, Gomez F, Escudier B, Lesimple T, Chevreau C, Douillard J-Y, Caty A, Geoffrois L, Ferrero J-M, Linassier C, Drevon M, Negrier S. Subcutaneous interleukin-2, interferon alpha-2a, and continuous infusion of fluorouracil in metastatic renal cell carcinoma: A multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* 1998;16:2728-2732.

153. Riccobon A, Ridolfi R, DePaola F, Barzanti F, Mosconi G, Ortolano F, Stefanelli M, Ibrahim T, Ridolfi L, Fabbri M, Flamini E, Amadori D. Vaccination with dendritic cells (DC) pulsed with heat shock proteins (HSP) or lysate from autologous tumor in advanced melanoma patients. *Proc ASCO* 2000;19:469a.
154. Ridout MS, Demetrio CG, Firth D. Estimating intraclass correlation for binary data. *Biometrics* 1999;55:137-48.
155. Robson C, Churchill B, Anderson W. The results of radical nephrectomy for RCC's. *J Urol* 1969;101:297-301.
156. Roigas J, Wallen ES, Moseley PL. Cell surface expression of HSP72 enhances NK lysis in the human renal carcinoma cell line ACHN. *Adv Exp Med Biol* 1998;451:195-200.
157. Roigas J, Wallen ES, Loening SA, Moseley PL. Effects of combined treatment of chemotherapeutics and hyperthermia on survival and the regulation of heat shock proteins in Dunning R3327 prostate carcinoma cells. *Prostate* 1998;34:195-202.
158. Roigas J, Wallen ES, Loening SA, Moseley PL. The role of heat shock proteins for vaccination models in renal cell carcinoma. *J Urol* 1999;161(Suppl):145.
159. Roigas J, Schulze G, Raytarowski S, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Tumor M2-Pyruvate Kinase (TUM2-PK) in Plasma of Patients with Urological Tumors. *Tum Biol* 2001;22:282-285.
160. Roigas J, Schroeder J, Rudolph B, Schnorr D. Renal cell cancer with a symptomatic heart metastasis. *BJU Int* 2002;90:622-623.
161. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985;313:1485-1492.
162. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 1987;316:889-897.
163. Ruckert RI, Schnorr D, Turk H, Muller JM. Surgical therapy of tumor embolism of the vena cava in renal cell carcinoma. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998;115:240-245.
164. Samland D, Steinbach F, Reiher F, Schmidt U, Gruss A, Allhoff EP. Results of chemoimmunotherapy with interleukin-2, interferon- $\alpha_2$  and 5-fluorouracil in the treatment of metastatic renal cell cancer. *Eur Urol* 1999;35:204-209.
165. Santarosa M, Favaro D, Quaia M, Galligioni E. Expression of heat shock protein 72 in renal cell carcinoma: possible role and prognostic implications in cancer patients. *Eur J Cancer* 1997;33:873-877.
166. Schneekloth C, Korfer A, Hadam M, Lopez Hanninen E, Menzel T, Schomburg A, Dallmann I, Kirchner H, Poliwoda H, Atzpodien J. Low-dose interleukin-2 in combination with interferon-alpha effectively modulates biological response in vivo. *Acta Haematol* 1993;89:13-21.
167. Schnorr D, Rückert RI, Böhm J, Roigas J, Türk I, Kastein A. Radikaloperationen von Nierentumoren mit intrakavalen und intrakardialen Tumorthromben. In *Nierenzellkarzinom – Renal Cell Carcinoma*. Eds. D. Schnorr, S.A. Loening. Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Wien, 1998, pp. 99-110.
168. Schomburg A, Kirchner H, Fenner M, Menzel T, Poliwoda H, Atzpodien J. Lack of therapeutic efficacy of tamoxifen in advanced renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 1993;29A:737-740.
169. Schroder A, Lampel A, Eggersmann C, Thuroff JW. Controversies in surgical therapy of renal cell carcinoma. *Urologe A* 1997;36:460-466.



170. Siebels M, Oberneder R, Buchner A, Zaak D, Mack A, Petrides PE, Hofstetter A, Wowra B. Ambulatory radiosurgery in cerebral metastatic renal cell carcinoma. 5-year outcome in 58 patients. *Urologe A* 2002;41:482-488.
171. Sierra-Rivera E, Voorhees GJ, Freeman ML. Gamma irradiation increases hsp-70 in Chinese hamster ovary cells. *Radiat Res* 1993;135:40-45.
172. Smith EM, Kursh ED, Makley J, Resnick MI. Treatment of osseous metastases secondary to renal cell carcinoma. *J Urol* 1992;148:784-787.
173. Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors, 6<sup>th</sup> edition. Wiley-Liss, New York 2002, pp. 193-195.
174. Srigley JR, Hutter RV, Gelb AB, Henson DE, Kenney G, King BF, Raziuddin S, Pisansky TM. Current prognostic factors – renal cell carcinoma: Workgroup No. 4. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997;80:994-996.
175. Srivastava PK, DeLeo A, Old LJ. Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3407-3411.
176. Srivastava PK. Peptide-binding heat shock proteins in the endoplasmatic reticulum: Role in immune response to cancer and in antigen presentation. *Adv Cancer Res* 1993;62:153-178.
177. Srivastava PK. Purification of heat shock protein-peptide complexes for use in vaccination against cancers and intracellular pathogens. *Methods* 1997;12:165-171.
178. Stadler WM, Kuzel T, Dumas M, Vogelzang NJ. Multicenter phase II trial of interleukin-2, interferon-alpha, and 13-cis-retinoic acid in patients with metastatic renal-cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1998;16:1820-1825.
179. Staehler G, Liedl B, Kreuzer E, Sturm W, Schmiedt E. Kidney cancer with invasion of the vena cava: classification, surgical strategy and results of treatment. *Urologe A* 1987;26:46-50.
180. Staehler G, Brkovic D. Renal cell carcinoma with vena cava involvement. Surgical strategies and results. *Urologe A* 1997;36:109-116.
181. Staehler G, Brkovic D. The role of radical surgery for renal cell carcinoma with extension into the vena cava. *J Urol* 2000;163:1671-1675.
182. Stahl M, Wilke H, Schmoll HJ, Schober C, Diedrich H, Casper J, Freund M, Poliwoda H. A phase II study of high dose tamoxifen in progressive, metastatic renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 1992;3:167-168.
183. Steinberg P, Storkel S, Oesch F, Thoenes W. Carbohydrate metabolism in human renal clear cell carcinomas. *Lab Invest* 1992;67:506-511.
184. Stephens ND, Barton SL, Smith AY, Paul RW, Neidhardt JA, Griffith JK. GM-CSF secretion in primary cultures of normal and cancerous human renal cells. *Kidney Int* 1996;50:1044-1050.
185. Storkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997;80:987-989.
186. Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 1995;269:1585-1588.
187. Swanson DA, Orovan WL, Johnson DE, Giacco G. Osseous metastases secondary to renal cell carcinoma. *Urology* 1981;18:556-561.
188. Tamura Y, Peng P, Liu K, Daou M, Srivastava PK. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* 1997;278:117-120.
189. Thoenes W, Störkel S. Die Pathologie der benignen und malignen Nierenzelltumoren. *Urologe A* 1991;30:W41-W50.

190. Thomas ML, Samant UC, Deshpande RK, Chiplunkar SV. Gammadelta T cells lyse autologous and allogenic oesophageal tumours: involvement of heat-shock proteins in the tumour cell lysis. *Cancer Immunol Immunother* 2000;48:653-659.
191. Todryk S, Melcher AA, Hardwick N, Linardakis E, Bateman A, Colombo MP, Stoppaccario A, Vile RG. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J Immunol* 1999;163:1398-1408.
192. Toma S, Monteghirfo S, Tasso P, Nicolo G, Spadini N, Palumbo R, Molina F. Antiproliferative and synergistic effect of interferon alpha-2a, retinoids and their association in established human cancer cell lines. *Cancer Lett* 1994;82:209-216.
193. Tourani JM, Pfister C, Berdah JF, Benhammouda A, Salze P, Monnier A, Paule B, Guillet P, Chretien Y, Brewer Y, Di Palma M, Untereiner M, Malaurie E, Tadrist Z, Pavlovitch JM, Hauteville D, Mejean A, Azagury M, Mayeur D, Lucas V, Krakowski I, Larregain-Fournier D, Abourachid H, Andrieu JM, Chastang C. Outpatient treatment with subcutaneous interleukin-2 and interferon alfa administration in combination with fluorouracil in patients with metastatic renal cell carcinoma: results of a sequential nonrandomized phase II study. Subcutaneous Administration Proleukin Program Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1998;16:2505-2513.
194. Trieb K, Lechleitner T, Lang S, Windhager R, Kotz R, Dirnhofner S. Heat shock protein 72 expression in osteosarcomas correlates with good response to neoadjuvant chemotherapy. *Hum Pathol* 1998;29:1050-1055.
195. Trieb K, Kohlbeck R, Lang S, Klinger H, Blahovec H, Kotz R. Heat shock protein 72 expression in chondrosarcoma correlates with differentiation. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000;126:667-670.
196. Tsuji Y, Goto A, Hara I, Ataka K, Yamashita C, Okita Y, Kamidono S. Renal cell carcinoma with extension of tumor thrombus into the vena cava: surgical strategy and prognosis. *J Vasc Surg* 2001;33:789-796.
197. Udono H, Srivastava PK. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med* 1993;178:1391-1396.
198. Udono H, Srivastava PK. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70. *J Immunol* 1994;152:5398-5403.
199. Udono H, Srivastava PK. Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: Tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo. *Proc Nat Acad Sci* 1994;91:3077-3081.
200. Van Herpen CM, Jansen RL, Kruit WH, Hoekman K, Groenewegen G, Osanto S, De Mulder PH. Immunochemotherapy with interleukin-2, interferon-alpha and 5-fluorouracil for progressive metastatic renal cell carcinoma: a multicenter phase II study. Dutch Immunotherapy Working Party. *Br J Cancer* 2000;82:772-776.
201. Varga Z, Hegele A, Stief T, Heidenreich A, Hofmann R. Determination of pyruvate kinase type tumor M2 in human renal cell carcinoma: a suitable tumor marker. *Urol Res* 2002;30:122-125.
202. Vendetti S, Cicconi R, Piselli P, Vismara D, Cassol M, Delpino A. Induction and membrane expression of heat shock proteins in heat-treated HPC-4 cells is correlated with increased resistance to LAK-mediated lysis. *J Exp Clin Cancer Res* 2000;19:329-334.
203. Voshol H, Dullens HF, Den Otter W, Vliegthart JF. Human natural killer cells: a convenient purification procedure and the influence of cryopreservation on cytotoxic activity. *J Immunol Methods* 1993;165:21-30.
204. Wallen ES, Roigas J, Moseley PL. Methods for purifying and synthesizing heat shock protein complexes. United States Patent Office, 5,747,332, May 5, 1998.

205. Wallen ES, Roigas J, Moseley PL. Purified heat shock protein complexes. United States Patent Office, 6,066,714, May 23, 2000.
206. Wallen ES, Roigas J, Moseley PL. Purified heat shock protein complexes. United States Patent Office, 6,433,141, August 13, 2002.
207. Wechsel HW, Petri E, Bichler KH, Feil G. Marker for renal cell carcinoma (RCC): The dimeric form of pyruvate kinase type M2 (TUM2-PK), *Anticancer Res* 1999;19:2583-2590.
208. Wechsel HW, Petri E, Feil G, Nelde H, Bichler K. Renal cell carcinoma. Immunohistological study to the expression of the inactive form of the pyruvate kinase, *Urologe A* 1999;38:583-585.
209. Wei Y, Zhao X, Kariya Y, Fukata H, Teshigawara K, Uchida A. Induction of autologous tumor killing by heat treatment of fresh human tumor cells: involvement of gamma delta T cells and heat shock protein 70. *Cancer Res* 1996;56:1104-1110.
210. Welch WJ. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Review* 1992;72:1063-1081.
211. Wells AD, Rai SK, Salvato MS, Band H, Malkovsky M. Hsp72-mediated augmentation of MHC class I surface expression and endogenous antigen presentation. *Int Immunol* 1998;10:609-617.
212. Wernecke KD. Persönliche Mitteilung. Berlin, 13.08.2003.
213. Winfield JB. Stress proteins, arthritis, and autoimmunity. *Arthritis Rheum* 1989;32:1497-1504.
214. Wirth MP. Immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 1993;20:283-295.
215. Yagoda A, Abi-Rached B, Petrylak D. Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983-1993. *Semin Oncol* 1995;22:42-60.
216. Younes A, Fayad LE, Pro B, McLaughlin P, Hagemester FB, Mansfield P, Clayman G, Medeiros LJ, Lewis J, Srivastava PK. Safety and efficacy of heat shock protein-peptide 96 complex (HSPPC-96) in low-grade lymphoma. *Proc ASCO* 2003;22:2294.
217. Younes E, Haas GP, Dezso B, Ali E, Maughan RL, Kukuruga MA, Montecillo E, Pontes JE, Hillman GG. Local tumour irradiation augments the response to IL-2 therapy in a murine renal adenocarcinoma. *Cell Immunol* 1995;165:243-251.
218. Younes E, Haas GP, Dezso B, Ali E, Maughan RL, Montecillo E, Pontes JE, Hillman GG. Radiation-induced effects on murine kidney tumour cells: role in the interaction of local irradiation and immunotherapy. *J Urol* 1995;153:2029-2033.
219. Zisman A, Pantuck AJ, Chao DH, Wieder JA, Dorey F, Said JW, Kernion JB, Figlin R, Belldegrun AS. Renal cell carcinoma with tumor thrombus: is cytoreductive nephrectomy for advanced disease associated with an increased complication rate? *J Urol* 2002;168:962-967.
220. Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, Chao DH, Gitlitz BJ, Moldawer N, Lazarovici D, deKernion JB, Figlin RA, Belldegrun AS. Mathematical model to predict individual survival for patients with renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002;20:1368-1374.
221. Zisman A, Chao DH, Pantuck AJ, Kim HJ, Wieder JA, Figlin RA, Said JW, Belldegrun AS. Unclassified renal cell carcinoma: clinical features and prognostic impact of a new histological subtype. *J Urol* 2002;168:950-955.

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	-	Adenosin-Di-Phosphat
AK	-	Antikörper
AP	-	Alkalische Phosphatase
APAAP	-	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
APC	-	Antigen-präsentierende Zellen
ATP	-	Adenosin-Tri-Phosphat
BCIP	-	Brom-Chlor-Indolylphosphat
BPH	-	Benigne Prostatahyperplasie
CD	-	cluster of differentiation
CI	-	Konfidenzintervall
CIT	-	Chemoimmuntherapie
CR	-	complete remission
13-CRA	-	13-cis-Retinsäure
CT	-	Computertomographie
CTL	-	zytotoxische T-Lymphozyten
DC	-	dendritische Zellen
3D-CT	-	3D-Computertomographie
DGCIN	-	Deutsche Gesellschaft zur Chemoimmuntherapie des NZK
EBRT	-	External beam radiotherapy
EDTA	-	Ethylen-Diamin-Tetraazetat
ELISA	-	Enzyme linked immunosorbent assay
EORTC	-	European Organization for Research and Treatment of Cancer
ER	-	endoplasmatisches Retikulum
FDA	-	Food and Drug Administration
FKS	-	fetales Kälberserum
5-FU	-	5-Fluorourazil
GKSZ	-	Ganzkörperskelettszintigraphie
Gy	-	Gray
HBSS	-	Hanks balanced salt solution
HEPES	-	Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure
HPLC	-	high performance liquid chromatography
HSP	-	Hitzeschockproteine
HSP70	-	70 kDa Hitzeschockproteinfamilie
HSP72	-	72 kDa Hitzeschockprotein
HSP73	-	73 kDa Hitzeschockprotein
IFN- $\alpha$ 2a	-	Interferon- $\alpha$ 2a
IFN- $\gamma$	-	Interferon- $\gamma$
IgG	-	Immunglobulin G
IL-2	-	Interleukin-2
IL-12	-	Interleukin-12
IMT	-	Immuntherapie
i.v.	-	intravenös
kDa	-	kilodalton
KHCO <sub>3</sub>	-	Kaliumhydrogenkarbonat
KÖF	-	Körperoberfläche
KPI	-	Karnofsky Performance Index
LAK	-	Lymphokin aktivierte Killerzellen
LDH	-	Laktatdehydrogenase

β-ME	-	β-Merkapto-Äthanol
MEM	-	minimum essential medium
MgCl <sub>2</sub>	-	Magnesiumchlorid
MHC	-	major histocompatibility complex
Mio	-	Millionen
MR	-	mixed response
MRT	-	Magnetresonanztomographie
NaHCO <sub>3</sub>	-	Natriumhydrogenkarbonat
NaCl	-	Natriumchlorid
NaN <sub>3</sub>	-	Natriumnitrat
NBT	-	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NED	-	no evidence of disease
NH <sub>4</sub> Cl	-	Ammoniumchlorid
NK	-	Natürliche Killerzellen
NNR	-	Nebennierenrinde
NZK	-	Nierenzellkarzinom
PBL	-	Periphere Blutlymphozyten
PBS	-	phosphat buffer saline
PCA	-	Prostatakarzinom
PD	-	progressive disease
PE	-	Phycoerythrin
PK	-	Pyruvatkinase
PMSF	-	Phenyl-Methyl-Sulfonylfluorid
PR	-	partial remission
PSA	-	prostataspezifisches Antigen
s.c.	-	subkutan
SD	-	stable disease
SDS	-	Natriumdodezylsulfat
TAP	-	transporter associated with peptide processing
TBS	-	TRIS buffered saline
TIA	-	transitorische ischämische Attacke
TNF-α	-	Tumornekrosefaktor-α
TRIS	-	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TU M2-PK	-	tumorspezifische Form der M2-Pyruvatkinase
UCA	-	Urothelkarzinom

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Urologie, Herrn Prof. Dr. S.A. Loening, der mich bei den wissenschaftlichen Projekten vertrauensvoll und zielstrebig beraten, sowie meinen Forschungsaufenthalt in den USA entscheidend unterstützt hat.

Die wissenschaftliche Tätigkeit bei Prof. P.L. Moseley und Ph.D. E.S. Wallen in Iowa City, Iowa und Albuquerque, New Mexico, war durch eine außerordentlich fruchtbare Zusammenarbeit gekennzeichnet. Ich danke meinen beiden Mentoren, die enge Freunde geworden sind, für die kreativste Phase in meiner beruflichen Tätigkeit herzlich.

Ich möchte auch der Leitung der Klinik für Urologie, namentlich Herrn Prof. Dr. D. Schnorr, Herrn Prof. Dr. B. Schönberger, Herrn Prof. Dr. S. Lenk und Herrn Prof. Dr. K. Jung, danken, da sie entscheidend meinen beruflichen Werdegang geprägt haben und mir die Freiräume im Klinikalltag für die wissenschaftliche Tätigkeit geschaffen haben.

Mein ganz spezieller Dank gebührt Herrn Prof. Dr. D. Schnorr, der mich als Mentor der Arbeit bei allen Problemen und Fragestellungen, sowohl fachlich als auch menschlich immer sehr hilfreich und vertrauensvoll beraten und niemals abgewiesen hat.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich auch Herrn Prof. Dr. K. Jung, dem Leiter der Forschungsabteilung der Klinik für Urologie, der mich bei der Durchführung der Projekte häufig wissenschaftlich und finanziell unterstützt hat.

Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. I. Kuchler und Herrn Prof. K.-D. Wernecke vom Institut für Medizinische Biometrie für die Hilfe bei der statistischen Auswertung des Datenmaterials und Frau OÄ Dr. B. Rudolph und Herrn Prof. Dr. S. Hauptmann vom Institut für Pathologie für die Betreuung bei den immunhistochemischen Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. P. Walden und Herrn R. Demine von der Klinik für Dermatologie danke ich für die konstruktiven Diskussionen und die kooperative, weiterführende Zusammenarbeit bei der Thematik der HSP70-Peptid-Komplexe. Ebenso bin ich Herrn OA Dr. F. Kern vom Institut für Medizinische Immunologie für die Hilfe bei der Durchführung der durchflusszytometrischen Untersuchungen und Frau OÄ Dr. B. Brux vom Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie für die Hilfe bei den Bestimmungen der TU M2-PK zu Dank verpflichtet.

Den Mitarbeiterinnen der Forschungsabteilung, insbesondere Frau M. Scholz, Frau I. Baumert und Frau H. Krievitz danke ich für die Unterstützung der experimentellen Arbeiten.

Letztlich schulde ich allen Mitarbeitern der Klinik, besonders jedoch meinen engen Kollegen, Herrn OA PD Dr. M. Lein, Herrn OA Dr. S. Deger und Herrn OA Dr. A. Wille meinen Dank für

das kollegiale Miteinander, das es erst möglich gemacht hat, den anspruchsvollen Alltag von Klinik, Lehre und Forschung erfolgreich miteinander in Einklang zu bringen.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift

## **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift